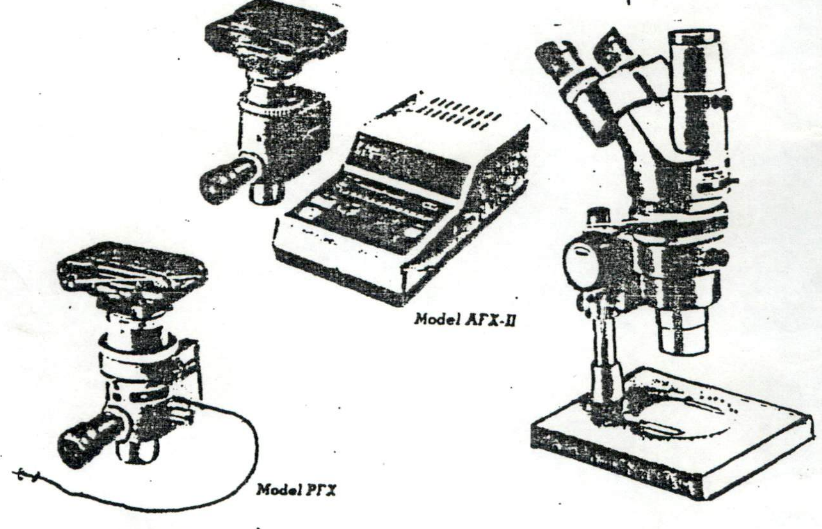
الميكروتكنيك والتصوير العلمي

علم دراسة الخلية والأنسجة



ا.د. متولى مصطفى خطاب   ا.د. عبد المنعم ابراهيم الفقى

م. على سليم حسان



١٩٨٨

بسم الله الرحمن الرحيم

تقـــديم

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وأصحابه والمسلمين أجمعين .

وبعد .... نقدم هذا العمل المتواضع ليكون مرشدا لكل العاملين في المعامل وفي مراكز البحث العلمي وفي الجامعات وفي المصانع ومراكز الانتاج ، ويدرس هذا المجال لأول مرة كمادة مستقلة سواء في المعاهد الفنية أو الجامعات .

نتمنى من الله أن يكون هاديا لنا ولكل من يتطلع الى العمل من أجل التقدم لمصر وللعرب أجمعين .

كما يسعدنا أن نتلقى المقترحات لتحسين أو اضافة أي جديد يراه الطالب أو الباحث حتى يكون العمل متكاملا .

في هذا الكتاب سوف نتناول موضوع الميكروتكنيك بصورة أقرب الى الناحية التطبيقية والعملية بعيدا بقدر الامكان عن النواحي العلمية البحتة لأن الهدف النهائي هو الاجابة على السؤال الذى يتردد على كل باحث في كليات الطب أو الزراعة أو مراكز البحوث المختلفة ... كيف تعد شريحة علمية تعبر عن الكائن المحضر منه هذه الشريحة ...؟ .

ولذلك فان دراسة هذا الفرع مرتبطة بالجزء العملي في المعمل واستخدام الطرق والأجهزة الحديثة لهذا الغرض .

ونتمنى أن يساعد هذا العمل ليكون دليلا لمعامل الأبحاث والميكروتكنيك .

مع تمنياتنا للجميع بالتوفيق والتقدم والسلام

دكتور/ متولى مصطفى خطاب
كلية الزراعة بمشتهر

دكتور/ عبد المنعم ابراهيم الفقى
كلية الزراعة بمشتهر

مهندس/على سليم حسان
وكيل المعهد الفني الكيماوى
بشبرا .

يناير ١٩٨٨

THE CELL in PLANT and ANIMAL

تعريف: هى وحدة النشاط البيولوجى للكائن الحى سواء كان نبات أو حيوان تحدد وتحاط بغشاء شبه منفذ Semipermable memb-rane وتستطيع أن تتكاثر وتجدد نفسها فى الوسط الذى تعيش فيه فى النظام الحيوى (نبات أو حيوان) وهذا التعريف لا ينطبق على الفيرس الذى لا يوجد له غشاء محدد شبه منفذ ويتكاثر فقط فى وسط الكائنات الحية (الخلية أو البيئة الخلوية) ولذلك يعيش الفيرس مرحلة أولية بسيطة للحياة لا تؤهله لأن يكون خلية • وفى دراستنا للميكروتكنيك تدور هذه الدراسة حول كيفية اعداد شريحة علمية تظهر التفاصيل الدقيقة للتركيب الخلوى داخل القطاع وبقدر الحصول على أكبر تفاصيل يسجل التقدم فى دراسة الميكروتكنيك التى احداها استخدام الميكروسكوب العادى ثم التقدم الهائل باكتشاف الميكروسكوب الالكترونى •

التركيب المثالى للخلية: Eukaryotic Cell.

الخلية ذات النواة The Euckaryotic Cells

أكبر من الخلية الأولية Prokaryotic cell والغشاء الثانوى يغطى النواة ويغطى المكونات الأخرى داخل الخلية وينقسم السيتوبلازم الى سيتوبلازم داخلى وآخر خارجى والداخلى يكون فى شكل شبكة Reticulum ، والخلية المثالية التركيب هى الموجودة فى النبات (ابتداء من الطحالب حتى النباتات الزهرية) ، وكذلك الموجودة فى الحيوان (ابتداء من البروتوزوا حتى الثدييات) ، وبالرغم من أن الخلية فى الكائنات الحية تختلف فى الشكل والحجم والوظيفة تتشابه من ناحية التركيب من حيث :ـ

الغشاء البلازمى ، السيتوبلازم ومحتويات السيتوبلازم مثال ذلك : الميتاكوندريا ، الشبكة الداخلية الأنبوبية البلازمية ، الريبوسوم أجسام جولجى ، حبيبات الدهن والنشا والبروتين .... وغيرها .. بالاضافة الى النواة : Nucleus . كما تحتوى على الأحماض النووية : DNA & RNA وهى موجودة فى السيتوبلازم والنواة وسنتناول الصفات العامة للخلية بالتفصيل كمايلى :

الشكل : Shape الخلية النباتية والحيوانية يختلف شكلها تبعا للبيئة الموجودة بها والوظيفة التي تؤديها ففي الخلية الحيوانية تكون مستديرة أو مثلثة ، أنبوبية الشكل ، مكعبة ، مستطيلة ، بيضاوية وكذلك يكون الشكل في النبات كذلك يختلف شكل الخلية حسب موقعها ووظيفتها في العضو الذي تدخل في تكوينه وفي داخل العضو نفسه تختلف أشكال الخلايا فيما بينها ، وبصفة عامة فان الشكل مرتبط بوظيفة العضو أو النسيج الذي تدخل الخلية في تكوينه ، مثال ذلك النسيج الطلائي يكون خلايا مبططة الشكل ، بينما النسيج العضلي تكون خلاياه مستطيلة الشكل وبالنسبة للبيئة الخارجية والداخلية قد يكون لها دخل في شكل الخلايا وكذلك في وظيفتها وكذلك ميكانيكية عمل العضو المكون لهذه الخلايا .

حجم الخليــة : Size بصفة عامة فان التركيب العام للخليــة يكون ميكروسكوبى ولكنه يكون أكبر من حجم البكتريا وحجم الخليــة يختلف من ١ ميكرون (μ ١) الى ١٧٥٠٠٠ ميكرون = (١٧٥ مم) كما في بيضة النعامة ، وأطول الخلايا يكون في الخلايا العصبية اذ يصل طول محورها في بعض الأنواع الى ٣٫٥ قدم .

عدد الخــلايا : Number of Cells في حالة الكائنات وحيدة الخلية The Unicellular تتكون من خلية واحدة مثل البراميسيوم والفلاجلم والأميبا وغيرها ، وكما في حالة البكتريا . ومعظم الحيوانات والنباتات تتكون أجسامها من عديد من الخــلايا ويطلق عليها حيوانات أو نباتات عديدة الخلايا وتســمى : Multicellular Anim.or Plant. ويرتبط عدد الخلايا في الأعضاء المختلفة للكائن بحجم الكائن نفســه ولذلك فان العضو الصغير الحجم يحتوى على عدد من الخلايا أقل من العضو الكبير الحجم .

تركيب الخلية : انظر الأشكال المرضحة المرفقة بالكتاب .

تركيب الخليـة

========

تتكون من المكونات الآتية :

أ- جدار الخلية والغشاء البلازمى Cell wall & plasma membrane.

ب- السيتوبلازم : Cytoplasm......

جـ- النواة : Nucleus..........

أ- جدار الخليـة : Cell wall

البروتوبلازم فى الخلية النباتية يحاط من الخارج بجدار خارجى سليلوزى أما الحيوانية فان الجدار الخارجى بروتينى التركيب ليعطى مرونة فى الحركة • والجدار الخلوى نصف حاجز (غشاء شبه منفذ) يتكون بصفة عامة من طبقتين الخارجية Non-living والداخلى living membrane ويفرز جدار الخلية بواسطة الخلية نفسها فى مراحل التكوين الأولى (الانقسام) ويتكون الجدار من السكريات العديدة من الكربوهيدرات والسليلوز وبينهما البروتين الذى يتكون من بلازما الخلية • وتحتوى الخلية النباتية على ثقوب فى جدارها لتكون وسيلة اتصال بغيرها من الخلايا المجاورة لها وتسمى هذه الثنرات أو الثقوب Plasmodesmata

وبعض الخلايا النباتية والحيوانية لها جدار خارجى يطلق عليه Plasmalema وجدار داخلى يطلق عليه الغشاء البلازمى Plasmaporous والغشاء البلازمى حيوى ودقيق جدا ومطاط elastic شبه منفذ Porous يغطى الخليـة مما يساعد على انتظام العمليات الميكانيكية بالخلية خارج البروتوبلازم (السيتوبلازم + النواة) ويحيط هذا الغشاء بمكونات الخليـة ويسمح بمرور مكونات الخليـة الى مختلف أجزائها وهذا الغشاء يتكون من طبقتين خارجية وداخلية من تركيب بروتينى بينهما دهن فى الطبقة الوسطى ويحتوى على كثير من الثقوب بما يسمح بمرور كثير من الجزيئات •

ب ـ السيتوبلازم : ....Cytoplasm

يلى الغشاء البلازمى الداخلى السيتوبلازم الذى يتحدد الى التراكيب التالية : مادة السيتوبلازم (المادة البين خلوية Cytoplasmic matrix) الذى يملاء الفراغ الموجود بين الغشاء البلازمى الخلوى والنواة بسائل السيتوبلازم وهو متجانس غروى يتكون من جزيئيات عضوية وأخرى غير عضوية مثل الماء والأملاح ص، بو ، ... وغيرها أما المادة العضوية فهى كثيرة مثل الكربوهيدرات والليبيدات (الدهون) ،والبروتينات ، والبروتينات النووية والأحماض النووية (DNA & RNA) وعديد من الانزيمات والطبقة الخارجية من السيتوبلازم تكون غير محببة شفافة الى حد ما وتسمى الطبقة السطحية الغروية Cortex or Plasmagel أو الطبقة الخارجية: Cortical layer or Ectoplasm (Gr.=ecto = outside, Plasma = form.) والطبقة الداخلية من السيتوبلازم تكون محببة أو حبيبية الشكل granular of matrix وتكون أقل لزوجة من الخارجية .

وفى داخل السيتوبلازم توجد تركيبات حية وأخرى غير حية .

أ ـ المحتويات الغير حية : ....Paraplasm

وهو الغذاء المخزن فى الخلية ويوجد فى شكل مادة بين خلوية على هيئة نقط زيتية أو حبيبات الح أو بقع أو حبيبات مفرزة أو حبيبات ، الجليكوجين .

ب ـ المحتويات الحية : ...Cytoplasmic organiols

مكونات حية فى عملية التمثيل البيولوجى والايض الغذائى مثل التنفس والبناء الضوئى والانتقال الغذائى وتكوين المواد ،وتخزينها والتكاثر وأهمها السنتروسوم والشبكة البلازمية الداخلية الأنبوبية ، والحبيبات القاعدية والأهداب أو الأسواط والشبكة السيتوبلازمية الداخلية وأجسام جولجى والليسومز ، والميتكوندريا ، والبلاستيدات والأحماض النووية DNA & RNA التى توجد فى الحبيبات القاعدية . وسنتناول بالتفصيل أهم هذه المكونات الحيوية بالخلية:

المكونات الحية فى السيتوبلازم :

١ـ الخيوط الدقيقة : ... Microflament

سيتوبلازم الحيوانات والنباتات يجرى به عديد من الأنابيب الدقيقة البروتينية tubulin تسمى Microtubules والوظيفة الرئيسية لهذه الانابيب نقل الماء والأيونات والجزيئات الصغيرة ، وتساعد على دوران السيتوبلازم وحركته داخل الخلية cyclosis كما أن هذه الخيوط تتكون أثناء تكوين المغزل خلال مرحلة انقسام الخليـة فى الانقسام الميتوزى Mitotic والميوزى Meiotic وتتصل أثناء ذلك بالجسم المركزى

والحبيبات القاعدية والأهداب والأسواط فى سيتوبلازم معظم الخلايا الحيوانية ينتشر فى سيتوبلازمها وتراكيب مشابهة بروتينية لتدعيم الخلية كما هو الحال فى حالة الخلايا العضلية Muscle cells

٢ـ الجسم المركزى : ..... Centrosome

يحتوى على سيتوبلازم كثيف ويقع بالقرب من النواة فى الخلية الحيوانية وفى حالة انقسام الخلية يظهر الجسم المركزى فى شكل قطبين على جانبى النواة يتصل بهم ٩ خيوط وكل وحدة خيط تحتوى على ٣ خيوط دقيقة ويظهر السنترومير بخيوطه أثناء عملية الانقسام ليساعد على حركـة الكروموسومات على المغزل المكون من هذه الخيوط لتفصل نصـف الكروموسومات فى كل مرحلة من مراحل الانقسام الخلوى .

٣ـ الحبيبات القاعدية : ...... Basal granules

فى حالة الخلايا الحيوانية والنباتية التى تحتوى على أعضاء مثل الأهداب والأسواط لتساعدها على الحركة تحتوى على أجسام مستديرة تعرف بالحبيبات القاعديـة فى أسفل الأهداب أو الأسواط وتوجـد فى السيتوبلازم الخارجى وكل حبيبة تتكون من ٩ خيوط دقيقة ، وكـل خيط يتكون من ٣ خيوط أدق من السابقة وتحتوى الحبيبات القاعديـة فى الجزء الخارجى منها على الأحماض النووية :

٤ـ الأهداب والأسواط : Cilia & Flagella

عديد من الكائنات وحيدة الخلية لها أهداب أو أسواط وفى التركيب الخلوى لبعض الكائنات الحيوانية والنباتية توجد أهداب (مثل الذى يوجد فى النسيج الطلائى الهدبى) . وتساعد الأهداب أو الأسواط

على حركة الخليـــة ، وهذه الأهداب أو الأسواط تتكون الواحدة منها من ٩ خيوط يحيطون بخيطان أكبر منها حجما ، وكل خيـط خارجي يتكون من خيطان أنبوبيان
وكل هدب أو سوط يتصل بحبيبة قاعديـة تتكون كيماويا من البروتينات والادينوسين والتربتوفان ، (ATP) .

٥ـ الشبكة البلازمية الداخلية Endoplasma reticulum
ان مادة السيتوبلازم ترتبط ببعضها بواسطة شبكة أنبوبية بجميــع أجزائها على شكل أوعيـــة تسمى Endoplasmic reticulum

وهى أعضاء أنبوبيـــة لها غشاء مكون من جزئين داخلى وخارجي بروتيني التركيب بينهما الدهن (الليبيدات) ويكون على اتصال بالغشاء ، البلازمى للنواة وبالشبكة الداخلية للنواة ويعمل على تدعيم الخليــة وتساعد على العمليات الميكانيكية للخلية وتعمل كالجهاز الدورى بين أجزاء الخليـــة المختلفـــة الداخلية والخارجيةوتعمل كمخزن للمواد داخل الخلية مثل الليبيدات والجليكوجين والكلوستيرول والجليسريدات والهرمونات.... الخ .

٦ـ أجسام جولجى : .... Golgi complex
توجد أجسام عضوية غشائية منتظمة فى صفوف فى السيتوبلازم وكل جسـم يتكون من عديد من الصفائح والأنابيب والأوعية والتجاويف ويتكون من ليبوبروتين ، ووظيفة أجسام جولجى هى مخازن للبروتينات والأنزيمات التى تفرز بواسطة الريبوسومات (الحبيبات الدقيقة) وتنقل بواسـطة الشبكة البلازمية الى هذه الأجسام وتفرز العديد من الريبوسـومز وفى النبات تسمى أجسام جولجى ديكتيسومز Dictysomes
وتفرز مادة مهمة فى تكوين جدر الخلايا أثناء عملية الانقسام للخلية.

٧ـ حوامل الأنزيمات:........ Lysomes
توجد فى الخلية الحيوانية أشكال مستطيلة على شكل حوامل Lysomes
وتحمل العديد من الأنزيمات الهاضمـــة Digestive enzymes
وهذه تهضم المواد التى تأتى الى الخلية عن طريق الامتصـاص Pinacocytosis أو الالتهام Phagocytosis
وحوامل الأنزيمات فى النبات تعمل كمخازن للأنزيمات الهاضمة والمحللة .

Cytoplasmic vacuoles:

٨ـ التجاويف السيتوبلازمية :

يحتوى السيتوبلازم عديد من النباتات وبعض الحيوانات التى تكون وحيدة الخلية (مثل البراميسيوم) يوجد بها تجاويف صغيرة أو كبيرة مملوءة بالسوائل ، وفى الخلايا الحيوانية تبطن هذه التجاويف بالليبوبروتين كما أن وظيفتها التخزين والنقل والمحافظة على الضغط الأسموزى للخلية ، وفى النبات تبطن هذه التجاويف بغشاء شبه منفذ يسمى Tonoplast وهذه التجاويف تحتوى على الماء ، والفينول ، والفلافونول ، والأنثوسيانين ، الصبغات الزرقاء والحمراء) والقلويدات كما تخزن السكريات والبروتين .

٩ـ الأجسام الدقيقة : Microbodies........

ان مادة الستوبلازم فى كثير من الخلايا مثل الخميرة ، والبروتوزوا ، وخلايا النباتات الراقية ، وخلايا الكبد Hepatocytes....... والكلية تحتوى على أجسام عضوية قطرها يتراوح مابين (٠ر٣ ــ ٥ر١ ميكرون) وهذه الأجسام تحتوى على بعض الأجسام المختلفة وهذه قد تعمل عمل الميتاكوندريا فى استخدام الأكسجين داخل الخلايا .

١٠ـ الريبوسومات : Ribosomes

حبيبات دقيقة مرتبطة بالشبكة البلازمية وتوجد حولها وتتكون فى النواة ثم تنتقل الى باقى أجزاء الخلية وتتكون هذه الجزيئات من الحامض النووى (RNA) بالاضافة الى البروتينات ، وكل حبيبة تتكون من جزئين الجزء الأول الصغير يسمى 40 S Subunit والجزء الثانى الكبير يسمى 60 S Subunit وبتبقيات الحبيبات يلتصق فى صورة 60 S Subunit بالشبكة الكروماتينية ويقسم الريبوسوم الى ٣ أنواع :

أـ RNA ريبسوم ب ـ 5 S ريبوسوم

جـ ـ 28 S ريبوسوم .

وعموما فان مواقع الريبوسوم مراكز لتصنيع البروتين فى الخلية .

١١ ـ الأجسام السبحية (الميتاكوند ريا) : ....Mitochondria

هى أجسام منتشرة فى السيتوبلازم فى شكل مجاميع تشبه المسبحة والقطاع العرضى فيها فى أى اتجاه يقرأ لفظ الجلالة (الله) " وفى أنفسكم أفلا تبصرون " ويختلف حجمها وكميتها من خلية الى أخرى ، وتحاط الميتاكوند ريــــا بغشاء ليبوبروتين وهو يشبه المحفظة بينما الداخلى يكون عدة تجويفات فى شكل صفائح داخلية فى فراغ الميتاكوند ريا ، وتملأ المسافة بين هذه الصفائح بمادة الميتاكوند ريا ووجد أن هذه المادة تحتوى على الأنزيمات المؤكسدة ...... Oxidative enzymes وساعدت هذه الانزيم وظيفة الميتاكوند ريا هى التنفس واكسدة الغذاء والحصول على الطاقة اللازمة للخلية أثناء عملية الميتابوليزم ......metabolism وتحتوى الميتاكوند ريا على جزئ DNA والريبوسومات ولها القدرة علـــى تخليق العديد من البروتينات .

١٢ ـ البلاستيدات: ...Plastides

توجد البلاستيدات بصفـــة عامة فى النبات ، ويبلغ قطرهـــا ٤ ـ ٦ ميكرون وتكون عديمـــة اللون أو ملونـــة والغير ملونة تسمى Leucoplastids أما الملونة Chromoplastids وتتلخص وظيفتها فى تصنيع وتخزين النشا والدهون (الليبيدات) وتأخذ البلاستيدات الملونة أشكال مختلفة وتكون فى صورة كلوروفيل ولذا تسمى Chloroplasts وهذه تحتوى على DNA وحبيبات من الريبوسوم ، والبروتين الكامل التكوين والبلاستيدات الخضراء هـــى مصنع الغذاء العالمى الربانى وسر الحياة الذى يصنع الغذاء فـــى النبات ومنه ينتقل الى الحياة ليستمر الخلق الى ماشاء الله وذلك عن طريق التمثيل الضوئى للنبات .

النواة فى الخليـــة NUCLEUS

النواة تقع فى منتصف الخليــــة وهى مستديرة الشكل وتسيطر على جميع العمليات الحيوية بالخلية وجميع نشاط السيتوبلازم ويوجد بها الحامض النووى المسيطر على جميع العمليات الحيوية الوراثيـــة وتتكون النواة من ٣ أجزاء هى :

١ ـ الغشاء النووى (الجدار) ٢ ـ بلازما النواة والكروموزمات

٣ ـ النويـــــة . ....Nucleolus

١ـ الغشاء النووى Nuclear membranes:

النواة تحاط بجدار مزدوج الطبقة من الليبوبروتين يحيط بالنواة من كل جانب به ثقوب فى أماكن كثيرة من جانبى النواة لتساعد على مرور المركبات من والى النواة والجزء الخارجى من النواة متصل بالشبكة البلازمية الداخلية للسيتوبلازم للقيام بعملية الربط الحيوى بين النواة والسيتوبلازم .

٢ـ البلازما النووية والكروموزومات: Nucleoplasma&Chromosom

تملاء النواة داخل الغشاء النووى بمادة مائية تسمى البلازما النووية Nucleoplasm...... وتحتوى البلازما على الفوسفات وسكر الريبوز ، والبروتين ، والبروتين النووى والاحماض النووية DNA & RNA ، ويحتوى البلازما فى وسطه على مايشبة الخيوط تسمى بالشبكة الكروماتينية التى تكون الكروموزومات فيما بعد CHROMOSOMES وتظهر الكروموزومات فقط خلال مرحلة انقسام الخلية ويتركب الكروموسوم أساسا من مادة كروماتينية على شكل خيط ويتركب كيماويا من

DNA

Deoxyribonucleic acid

الذى يكون على شكل لفافة حول متبقيات ....RNA

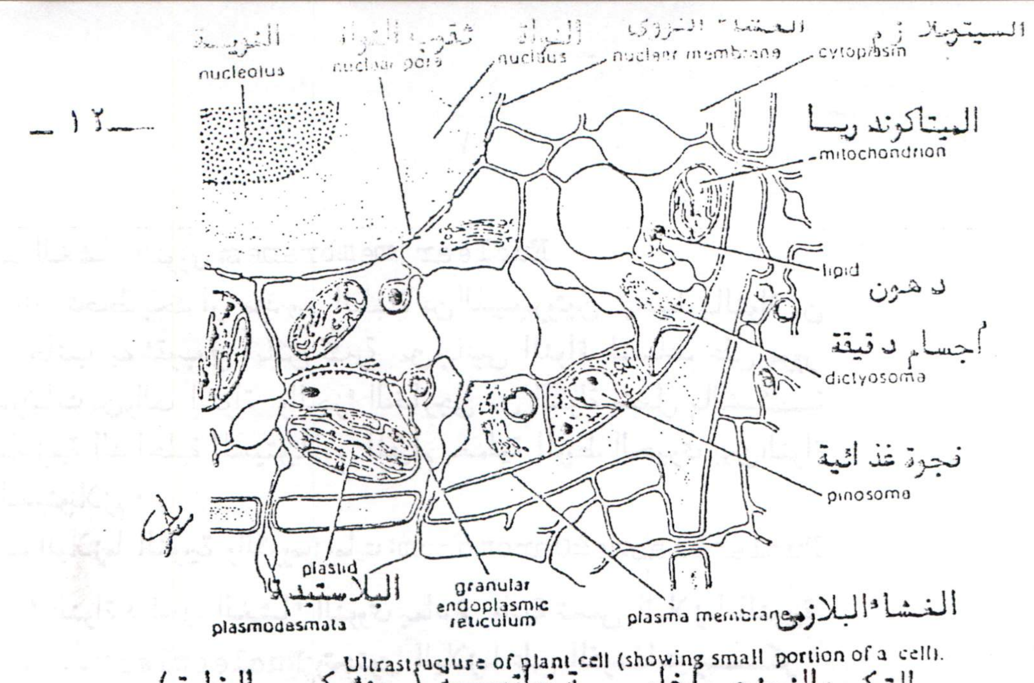
وأحماض نووية أخرى .

٣ـ النوية : Nucleolus

جسم يوجد فى النواة فى شكل شبكة ملتفة تترك كيماويا من كميات كبيرة من الريبوسومات البروتينية وحبيبات RNA وتعتبر تمخزن لحبيبات RNA التى مناطق لتكوين لحامض........DNA

وفيما يلى ملخص مصور لأشكال الخلية فى الحيوان والنبات التركيب المثالى للخلية ومكوناتها كما انتهى اليه البحث العلمى باستخدام الطرق المختلفة لعلم التشريح (الهستولوجى) مع استخدام الميكروسكوب الالكترونى ، مما أدى الى ظهور علم جديد هو الهندسة الوراثية .

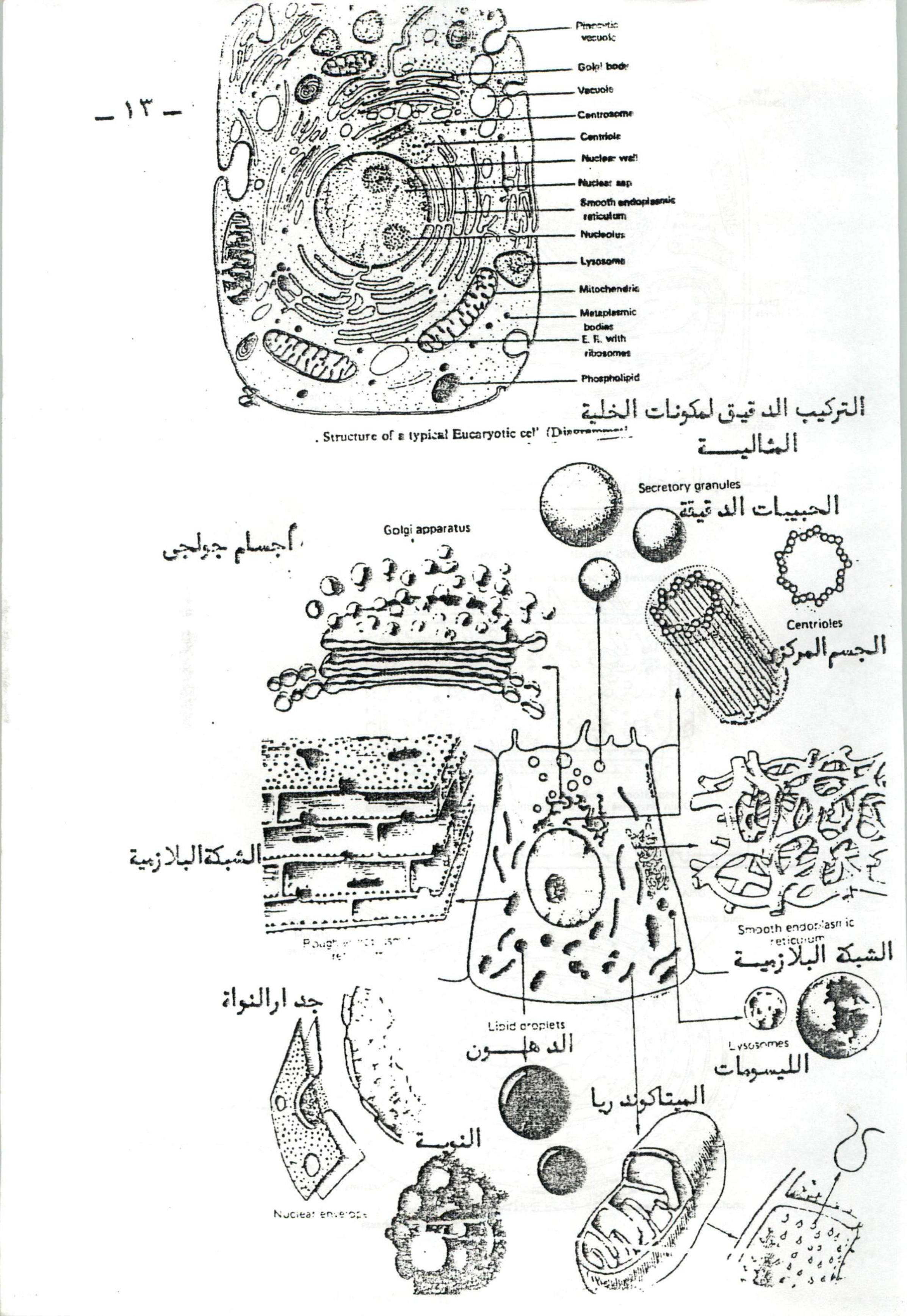
انظر الاشكال (ص page 23)



Ultrastructure of plant cell (showing small portion of a cell).

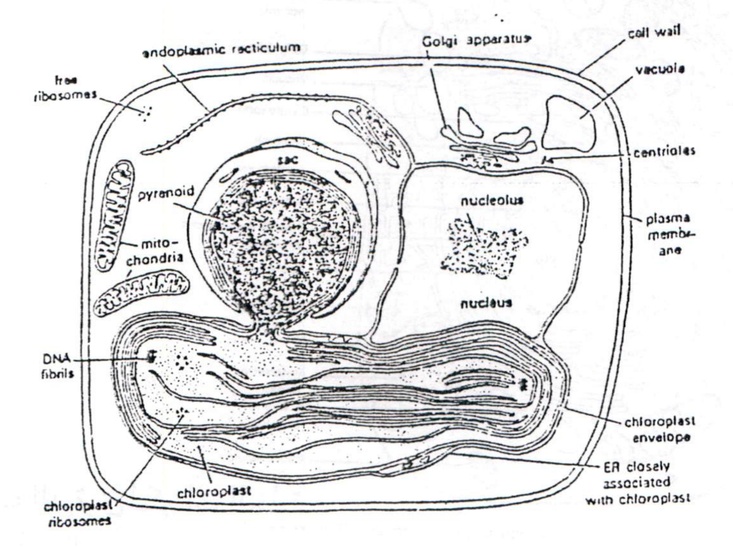
التركيب النموزجي لخلية نباتية (جزء مكبر من الخلية)

Structure of a typical eukaryotic animal cell.

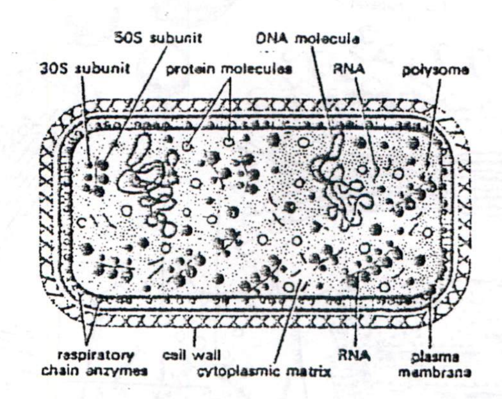


Structure of a typical Eucaryotic cell (Diagrammatic)

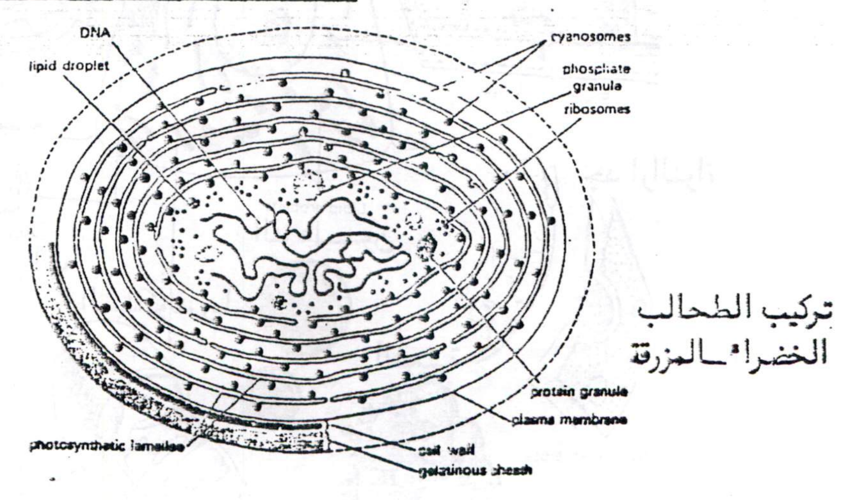
التركيب الدقيق لمكونات الخلية المثاليـــة



التركيب التفصيلى للطحالب البنية

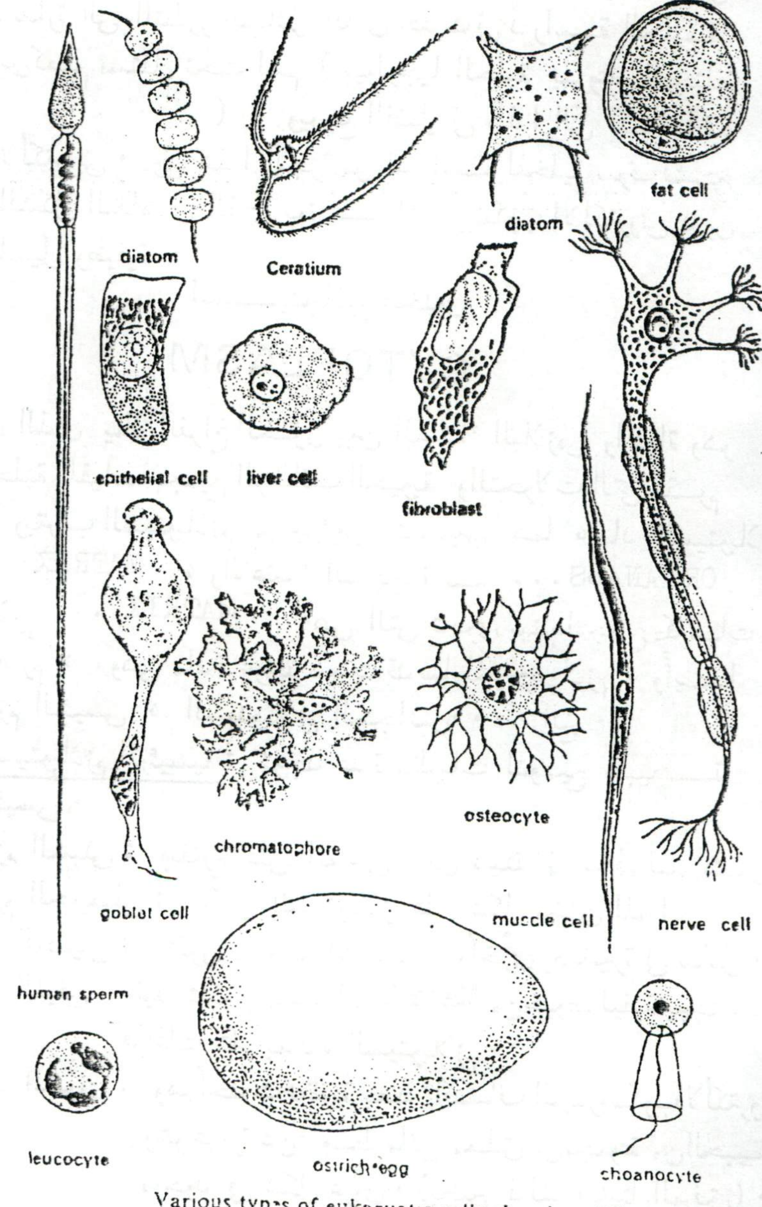


التركيب المثالى للبكتريـــا



تركيب الطحالب الخضراء المزرقة

الأشـــكال المختلفـــة للخلايا



Various types of eukaryotic cells showing different shapes.

=== الوصف الدقيق لبعض مكونات الخليـــة ===

تعتمد دراسة الميكروتكنيك فى كل من النبات والحيوان على الدراسة الدقيقة لمكونات الخلية تحت المجهر باستخدام طرق تحضير العينات بمختلف الطرق التى سيأتى ذكرها بالتفصيل فى هذا الكتاب، ولذلك كان من الضرورى الاشارة الى التطور الهائل الذى حدث فى دراسة الخلية اذ أصبح يدرس كعلم مستقل تحت اسم (بيولوجيا الخلية بفروعه المختلفة) ، ويرجع الفضل فى هذا الى اكتشاف الميكروسكوب الالكترونى . وفى هذا الجزء من الدراسة للخلية سوف نشير باختصار الى الشكل الظاهرى الذى يوضحه الميكروسكوب الالكترونى دون الدخول فى تفاصيل وظيفية .

السيتوبلازم الخلوى

CYTOPLASM

هو الجزء الذى يملأ الفراغ الخلوى بين الغشاء البلازمى والنواة وهو أهم جزء فى الخلية لقيامه بجميع الوظائف الحيوية والتحولات التى تقوم بها الخلية ، ويتركب السيتوبلازم من جزئين رئيسيين هما ، مادة السيتوبلازم السيتوبلازم MATRIX ، والاعضاء الموجودة بـ ... ORGANALS .

ومادة السيتوبلازم ....MATRIX : هى التى تحوى بينها جميع مكونات وأعضاء السيتوبلازم ، وهى مادة غروية سميت قديما بالبروتوبلازم ، وأيضا سمى السيتوبلازم الرئيسى ، السيتوبلازم المتجانس.... الخ .

<u>طبيعة مادة السيتوبلازم الرئيسية</u> : توجد عدة نظريات لتوضيح طبيعة السيتوبلازم الرئيسى .

١ـ السيتوبلازم الشبكى : ويقترح على أنه على شكل شبكة ذى شكل [illegible] متصل .
٢ـ السيتوبلازم الحويصلى : ويكون السيتوبلازم على شكل مخزن للمواد .
٣ـ السيتوبلازم الحبيبى : يتكون من حبيبات دقيقة وأخرى صغيرة فى سائل .
٤ـ السيتوبلازم الليفى : وفيه تتكون مادة الـ Matrix من خيوط ليفية يوجد بها فراغات تلأ بمادة السيتوبلازم .
٥ـ السيتوبلازم الغروى : وهو أحدث نظرية بعد اكتشاف الميكروسكوب الالكترونى وهو عبارة عن وسط مائى معلق من مجموعة من الحبيبات موجود فى شكل غروى . (يوضح ذلك الشكل المرفق) .

وبذلك يتكون السيتوبلازم الرئيسي من الماء كمذيب للمواد الحيوية كالجلوكوز والأحماض الأمينية ، والأحماض الدهنية والمواد الالكتروليتية والأملاح المعدنية والفيتامينات والهرمونات وغيرها ٠٠ وبذلك تتكون مادة السيتوبلازم الرئيسى ....Matrix من سائل مائى يحتوى على جزيئات كبيرة مثل البروتين وجزيئات صغيرة مثل الزيوت ، ويتوقف شكل السيتوبلازم المرئى تبعا لنوع الروابط بين مكوناته ٠

التركيب الكيماوى لمادة ال Matrix : يتركب السيتوبلازم الرئيسى من عناصر كبرى مثل O ٦٢% ، C ٢٠% ، H ١٠% ، N ٣% ، وعناصر بكميات صغيرة مثل Ca ٢،٥% ، P ١،١٤% ، Cl ٠،١٦% ، S ٠،١٤% ، K ٠،١١% ، Na ٠،١٠% ، Mg ٠،٠٧% ، Fe ٠،٠١% ، I ٠،٠١٤% ٠

وتحتوى السيتوبلازم على : ١ــ المركبات الغير عضوية : مثل الماء والأملاح وسنتناول بالتفصيل الماء لأهميته فى عمليات الميكروتكنيك خلال الخطوات المختلفة لاعداد العينة ، سواء فى عمليات التشريح أو التثبيت والقتل وغير ذلك من عمليات الميكروتكنيك كما ستوضح فى الأبواب التالية ٠ ويكون الماء ٦٥ ــ ٨٠% من مادة السيتوبلازم الرئيسية Matrix ويوجد الماء فى صورتين ، الماء الحر Free water والماء المرتبط Bound water وأكثر من ٩٥% من ماء السيتوبلازم يستخدم كمذيب للمواد الغير عضوية والمواد العضوية وهو مايعرف بالماء الحر ، وال ٥% المتبقية من الماء ترتبط بالبروتين فى روابط هيدروجينية وهو مايعرف بالماء المرتبط ، وتختلف نسبة الماء المكون للكائن الحى تبعا لعمر الكائن ومعيشته والنشاط الذى يؤديه الكائن فالجنين يحتوى ٩٠ــ ٩٥% ماء تنخفض بعد ذلك فى الكائن البالغ ٠ والحيوانات البحرية تحتوى على ماء أكثر من التى تعيش على اليابسة ، وتختلف نسبة الماء من خلية الى أخرى تبعا لنسبة ومعدل التمثيل :ــ

وترجع أهمية الماء فى الخلية لوظائفها العديدة ومنها :

١ــ يعتبر الماء مذيب حيوى جيد Biological solvent للمواد الغير عضوية مثل أيونات المعادن ، والأملاح وغيرها وللمواد العضوية مثل البروتين والكربوهيدرات ٠

٢ــ يعتبر الماء ناقل جيد لمكونات السيتوبلازم داخل الخلية وخارجها ٠

٣ـ نظرا لكفاءة الماء الحراريـــة ولذلك يحافظ على على درجة حرارة الخلية ثابتـــة ٠

٤ـ يعتبر الماء مذيب الكتروتي عالى وثابت داخل الخليـة ٠

٥ـ يعتبر الماء مهم جدا فى عمليات تمثيل وتحلل المواد اذ أنها تتم فى وسط سائل

٦ـ يحافظ الماء على الدهون من الاختلاط بمكونات الخلية الأخرى ٠

٧ـ يعتبر الماء منفذ للضوء وهذا مهم فى عمليات البناء الضوئى حيث أن ، البلاستيدات الخضراء تمتص أشعة الشمس فى عملية التمثيل الضوئى ٠

وغير ذلك من الوظائف " مصداقا لقول الله ، وجعلنا من الماء كل شىء حى "

أما المركبات العضويـــة : الموجودة فى مادة السيتوبلازم الرئيسية فهى عديدة وتشمل المركبات الكيماوية التى تحتوى على كربون C متحد مع واحد أو أكثر من العناصر مثل الهيدروجين H والنتروجين N والكبريت S وتعرف بالمركبات العضوية ويوجد بالسيتوبلازم ، الكربوهيدرات ، الليبيدات والبروتينات والفيتامينات ، والهرمونات ، والأحماض النووية ٠

الغشـــاء الخلوى البلازمى
Plasma membrane

هو الغشاء الداخلى للخلية الذى يحيط بالسيتوبلازم وقد أثبت الفحص بالميكروسكوب الالكترونى أن الخلية النباتية يوجد لها جدارين خارجى سليلوزى وداخلى بروتوبلازمى أما فى الخلايا الحيوانية فكلا الجدارين بروتوبلازمى ، وقد ثبت أن الجدار يتكون من جدارين من البروتين بينهما جدار ثالث من الليبيدات ونفس التركيب يوجد فى الغشاء النووى المبطن للنواة وكذلك غلاف الميتاكوندريا ويتراوح قطر الغشاء الخلوى بين ١٠٠ ـ ٢١٥ انجستروم ، وفى حالة النسيج الـثلاثى فى المعدة (الطبقة المخاطية) وجد أن سمك جدر خلاياها ١٠٥ أنجســـتروم ، ويحتوى الغشاء الخلوى على ثقوب دقيقة تتراوح مابيـن ٨ ـ ٨٠ أنجستروم ٠ (A°) ٠

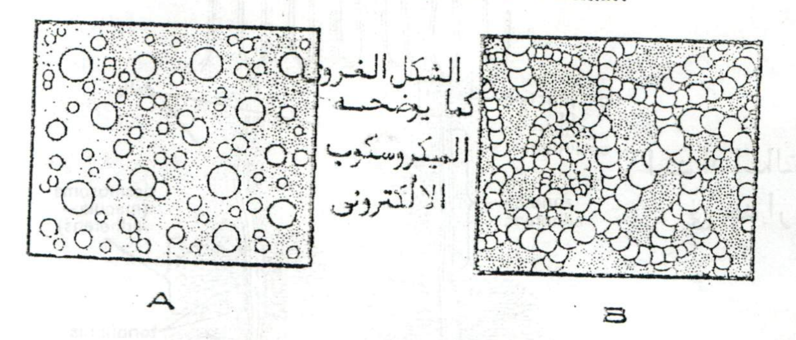
وفى أنسجة الحيوانات عديدة الخلايا توجد فراغات بين الأغشية البلازمية تتراوح مابين ١٠ ـ ١٥٠ انجستروم تحتوى على مواد غير معروفة التركـــيب الكيماوى حتى الآن ٠ كما أن جدار المعدة يحمل زوائد طرفية مهمة فى عملية الهضم والامتصاص ، وتزيد هذه الزوائد فى حالة خلايا الكلية الطلائية (كما فى الشكل المرفق) ٠

A B

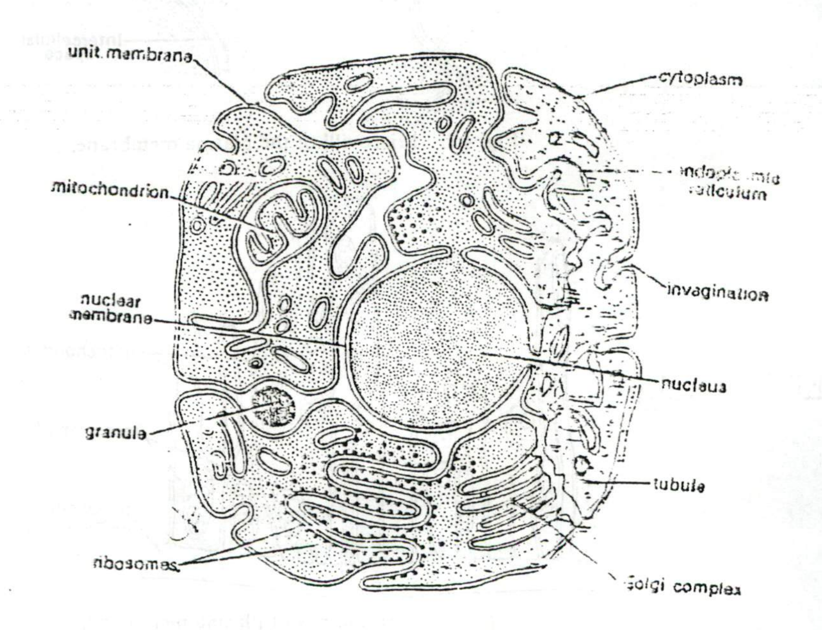
أشكال السيتوبلازم

C D

Physical appearance of protoplasm. A—Reticular, B—Alveolar, C—Granular, and D—Fibrillar.



الغشـــــاء الخلوي واتصاله بمكونات الخلية



الفراغات بين الغشاء الخلوى

Fig. 4·3. Inter-cellular space.

امتدادات الغشاء الخلوى
فى جدار خلايا المعدة

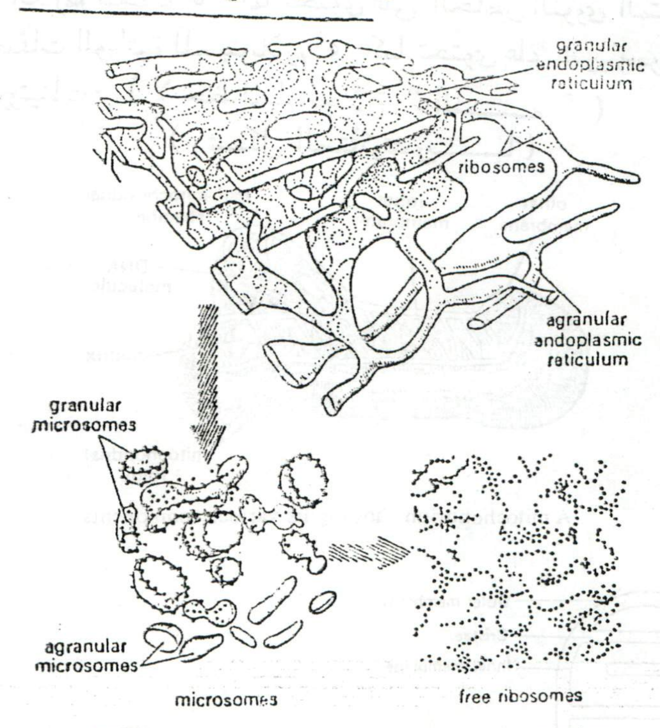
Fig. 4·4. Microvilli of the plasma membrane.

زوائد خلايا الكلية

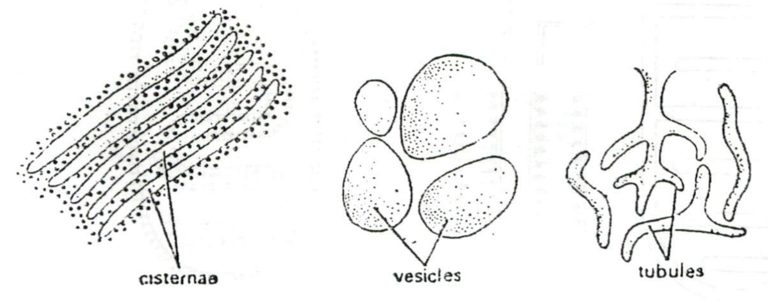
Fig. 4·5. Infoldings of plasma membrane.

الشبكة البلازمية الداخلية
ENDOPLASMIC RETICULUM

ينتشر فى سيتوبلازم الخلية شبكة بلازمية داخلية بينها فراغات ويختلف وجود تلك الشبكة من خلية الى أخرى حيث تختفى من البيضة بينما توجد بدرجة قليلة جدا فى الحيوان المنوى ، كما تنتشر فى خلايا الأنسجة الدهنية ، وفى الغدة جار الكلية ، وفى الخصية ، كما تنتشر فى خلايا البنكرياس وفى غيرها من الغدد الصماء ، وتحتوى خلايا الكبد على النوعين من الشبكة البلازمية (الحبيبية والخيطية) (الشكل التالى يوضح شكل الشبكة البلازمية)



Three dimensional structure of endoplasmic reticulum showing microsomes and ribosomes.

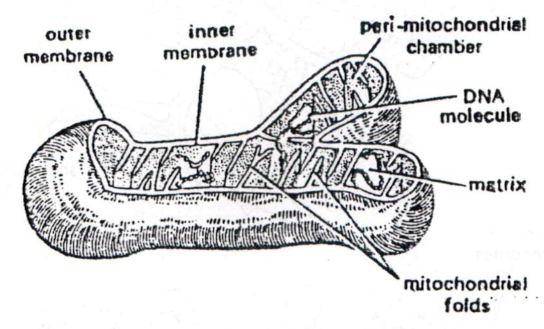


Various components of the endoplasmic reticulum.

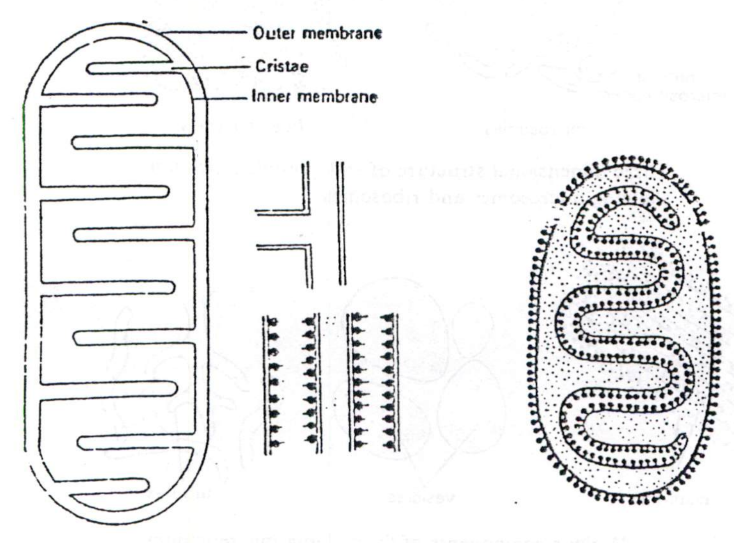
الميتاكـــوند ريـــا

الميتاكوند ريا هى أجســام ســبحية منتشــرة فى ســيتوبلازم جميع الخــلايا النباتيــة والحيوانية ، وفى معظم الكائنات الد قيقــة وحيدة الخليــة مثل البروتوزوا والطحالب ، بينما تختفى من خــلايا البكتريا ، وتتكون على شكل علبة من غشاء بلازمى يتركب من الليبوبروتين تحتوى بد اخلها على صفائح وتحوى أنزيمات ومرافق الأنزيمات لامكان الحصول عــلى الطاقــة اللازمة للخلية ، كما تحتوى على الحامض النووى المتخصص الحامل للصفات الوراثية للسيتوبلازم ، كما تحتوى على الريبوسومات اللازمة لتكوين البروتينات . (لا حظ لفظ الجلالة " اللــــه ")

(شــكل الميتاكوند ريـــا)



A mitochondrion showing its various components



. Diagrammatic sketch of mitochondria (After Palade).

.. Diagrammatic sketch of mitochondria with mitochondrial particles. (After Paule de Santo).

النواة والشبكة الكروماتينية
NUCLEUS & CHROMATIDES

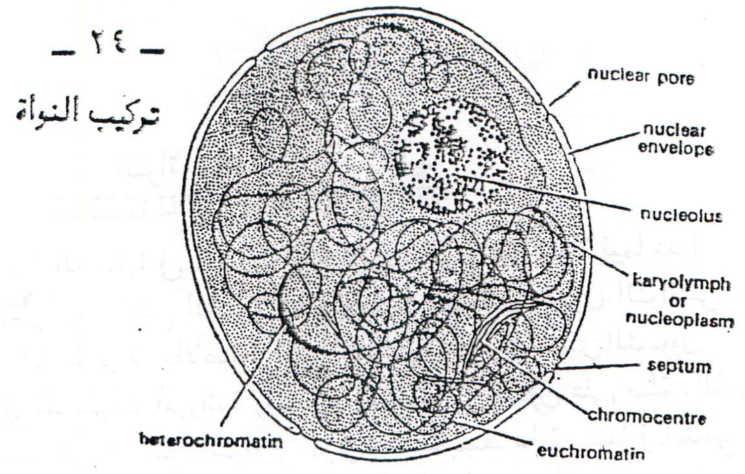
كل الخلايا الحقيقية فى النبات والحيوان تحتوى على نواة فيما عدا القليل النادر مثل كرات الدم الحمراء تختفى منها النواة وتحتوى النواة على جميع المواد اللازمة للحياة بالاضافة الى احتوائها على الحامض النووى اللازم للعمليات الوراثية وانتقال الصفات ، ويكون على صلة بالذى موجود فى السيتوبلازم ، وتقع النواة فى مركز الخلية بصفة عامة بينما فى النسيج الدهنى توجد على جانب الخليـــة ، وتحاط النواة بغشاء مزدوج الجدار أحدهما خارجى والآخر داخلى وكلاهما قطره ٩٠ — ١٥٠ انجستروم ، ويتركبان من الليبوبروتين وتوجد مسافة بينهما تتراوح مابين ١٠٠ — ١٥٠ A° ويتصل الغشاء الخارجى بالميتاكوندريا والريبوسومات والشبكة البروتوبلازمية وغيرها من مكونات الخلية ، بينما الغشاء الداخلى يتصل بالبلازما والشبكة الكروماتينية ، كما ينتشر على الغشاء النووى ثقوب عدد هذه الثقوب تبعا لاختلاف النوع والوظيفـــة التى تؤديها الخليـــة ويبلغ قطر هذه الثقوب ٨٠٠ انجستروم . وتحتوى النواة على سائل بلازمى شفاف يتكون من البروتينات بمختلف أنواعها والليبيدات كما تنتشر به الشبكة الكروماتينية التى تقسم الى نوعان تبعا لشدة الصبغ ١ — نوع غامق لشدة قابليته للصبغ Heterochromatin وهذه تحتوى على كمية قليلة من DNA وكميـــة كبيرة من RNA ٢ — نوع فاتح شفاف لقلة قابليته للصبغ Euchromatine وتتركب من الحامض النووى RNA والبروتينات الأخرى .

<u>النوية</u> : يختلف شكل النوية من الشكل الحبيبى الى الشكل الليفى الشبكى أو الشفاف وهى تعمل كمخزن للبروتينات الناتجة من الريبوسومات وللحامض النووى RNA .

CHROMOSOMES
الكرومـوســـــــــومات

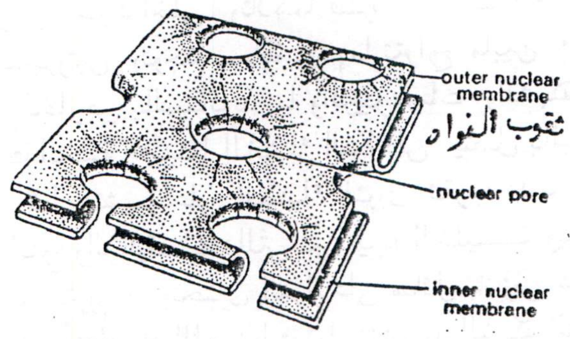
الكروموسومات أحد مكونات النواة وتظهر أثناء انقسام الخليـــة وتلعب الدور الرئيسى فى الوراثة ونقل الصفات الخاصة بالكائن الحى ، ولكل كائن حى عدد ثابت لايتغير من الكروموسومات ، كما يختلف حجم وشكل الكروموسوم تبعا للكائن والصفات التى ينقلها كل كروموسوم (ويوضح الشكل المرفق ذلك) .

تركيب النواة



Structure of a metaphase nucleus.

ثقوب النواه



Three dimensional structure of nuclear envelope.

تركيب الكروموسوم

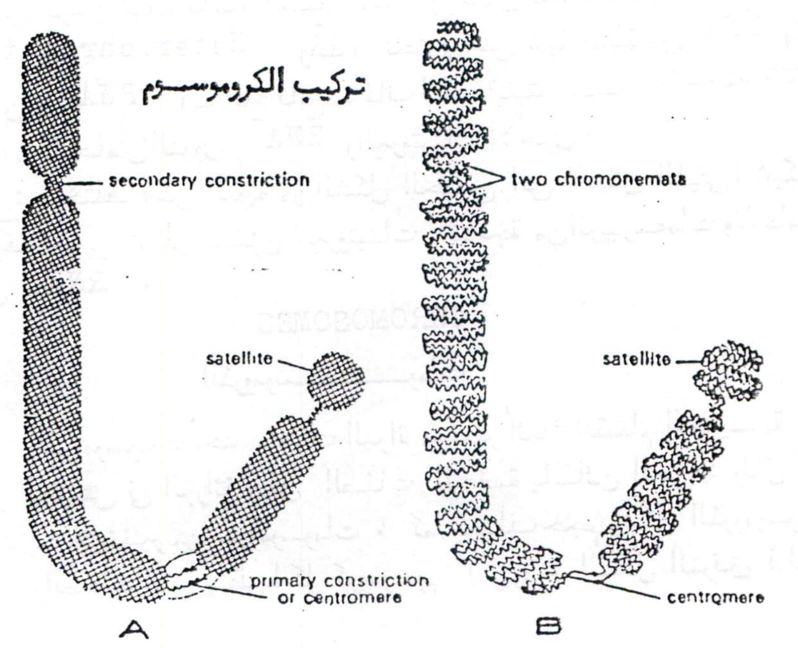


Diagram of a metacentric chromosome. A—External structure. B—Internal structure.

CELL DIVISION

ان نمو وتكاثر الكائن الحى سواء كان نبات أو حيوان يعتمد بصفة أساسية على تضاعف عدد خلاياه، ونموها فى الحجم . ان التكاثر اللاجنسى والجنسى يعتمد أساسا على الانقسام الخلوى ، وانقسام الخلية يرتكز على خطوتين هما انقسام النواة ثم انقسام السيتوبلازم .

وفى النبات والحيوان يوجد ثلاثة أنواع لانقسام الخلية :ــ

١ــ الانقسام المباشر: Direct cell division or Amitosis

٢ــ الانقسام الغير مباشر: Indirect cell division or Mitosis

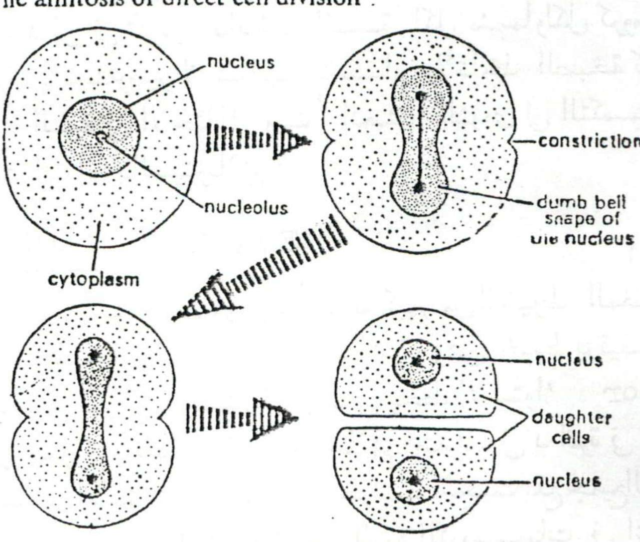
٣ــ الانقسام الاختزالى : Reduction division or Meiosis

١ــ الانقســام المباشــر AMITOSIS

الانقسام المباشـــر هو طريقة التكاثر اللاجنسية فى الكائنات وحيــدة الخليـــة مثل البكتريا والبروتوزوا وقد يحدث فى بعض أنسجة بعض الفقاريات وفى هذا النوع من الانقسام يحدث انقسام للنواة أولا ثم تتبع بانقســام للسيتوبلازم حيث تستطيل النواة ثم تنضغط من الوسط حتى تنقسم الى نصفين ، وانقســام النواة يتبع فى نفس الوقت بانقسام السيتوبلازم الى نصفين أيضا وبذلك تعــطى الخليــة الواحدة خليتان .

AMITOSIS

The amitosis or direct cell division .



Diagrammatic representation of amitosis.

٢ـ الانقسام غير المباشر (الميتوزى)
MITOSIS

تتطور خلية الزيجوت الناتجة عن الاخصاب فى النباتات الزهرية ،وكذلك خلية الزيجوت فى الحيوانات تتطور كلاهما الى فرد بالغ بانقسامها الى خليتين جديدتين ثم انقسام كل منهما على التوالى فيتكون أربع خلايا وهكذا تتكرر العملية مرات عديدة تصل الى عدة ملايين ليتكون النبات أو الحيوان حسب نوعه وشكله . ويشمل انقسام الخلية عمليتين الأولى انقسام النواة أو مايسمى بال Karyokinesis أو Mitosis والثانية انقسام تالى للسيتوبلازم Cytosome أو Cytokinesis وتعرف الخلية التى لم تدخل فعلا فى عملية الانقسام بأنها فى طور السكون أو مابين الطورين interphase أو resting stage وهى تستعد لانقسام تالى ، وتكون الكروموسومات أثنائه غير مميزة عن بعضها البعض مكونة الشبكة الكروماتينية ثم تستعد الخلية للانقسام الغير مباشر مكونة الخلايا الجسمية مارة بالمراحل التالية :ـ

١ـ الطور التمهيدى : PROPHASE

وفيه تأخذ الشبكة الكروماتينية فى الانقسام الى عدد من الكروموسومات يتكون كل منها من كروماتيدتان two chromatids ويحدث انفلاق كل كروموسوم أثناء طور السكون أو عند بدء الطور التمهيدى ، ثم تأخذ كل منها فى القصر فى الطول نتيجة لتزايد تكوين الحلزون وتظهر أكثر سمكا كلما تقدم هذا الطور ، كما تبدآن فى تكوين مادة مغلفة لكل منهما ولكل كروموسوم منطقة خاصة تعرف بالسنترومير لا يشملها الانقسام ولا تأخذ الصبغة كبقية الكروموسوم ، وتبدأ النوية فى الاختفاء ويبدأ الغشاء النووى فى التكسر ، وبذا تختلط محتويات النواة بالسيتوبلازم .

٢ـ الطور الاستوائى : METAPHASE

عندما يتم تكسر الغشاء النووى يبدأ عدد كبير من الخيوط المغزلية Spindle fibres فى الظهور مباشرة وهى خيوط دقيقة متوازية تقريبا يعرف طرفيها بالقطبين ومنطقتها الوسطى بخط الاستواء equator وعندئذ تتحرك الكروموسومات ببطء فى السيتوبلازم وتترتب فى دائرة فى وسط الخلية وفى المستوى الاستوائى للخيوط المغزلية بحيث تقع جميع السنترومير فى المستوى الاستوائى وتلامس المغزل وتتدلى أذرع الكروموسومات فى اتجاه مواز لاتجاه القطبين ، ويسهل فى هذا الطور عد الكروموسومات ووصفها .

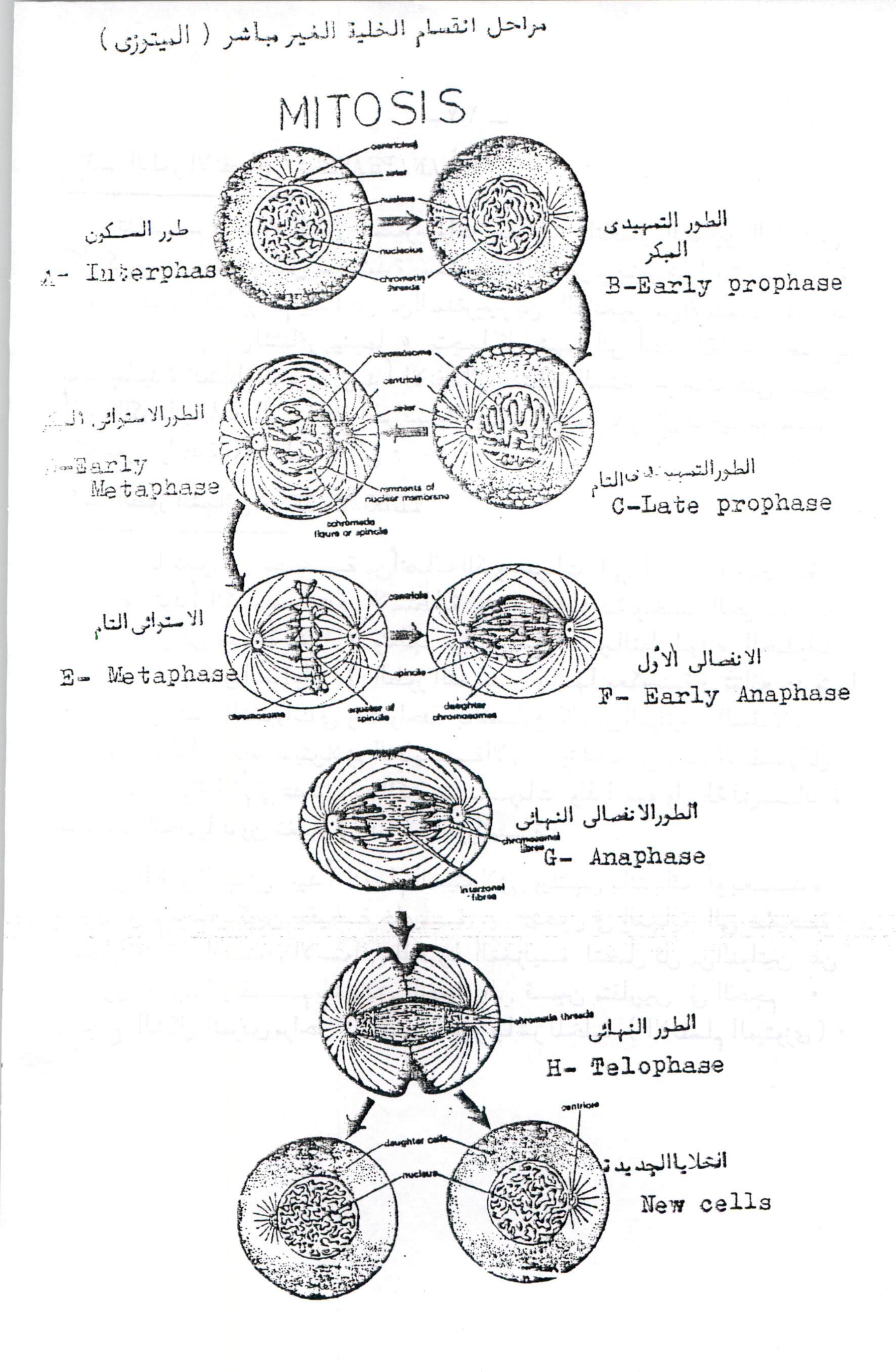
٣ـ الطور الانفصالى : ANAPHASE

تنقسم فى هذا الطور السنتروميرات وبذا يتم انفصال النصفين الطوليين لكل كروموسوم ويصبح لكل كروماتيدة سنتروميرها الخاص ويعتبر هذا التغير البداية المبكرة لهذا الطور ثم يبدأ كل من السنتروميرين الناتجين من الانقسام فى التباعد عن بعضهما البعض للتنافر بينهما ، متجها كل منهما الى أحد القطبين مصحوبا بالكروماتيدة المتصلة بـه ، ويبدأ الانفصال بمنطقة السنترومير ويمتد على طول أذرع الكروماتيدات الى ناحية أطرافها وتكون الكروموسومات فى كل ناحية مجموعتين مكتظتين واحدة بكل قطب مغزلى .

٤ـ الطور النهائى : TELOPHASE

عندما تصل كل مجموعة من أنصاف الكروموسومات الى القطب المتجهة اليه تبدأ الكروموسومات فى الاستطالة وتزول الحلزنة وتختلط الخيوط ويتكون حول كل مجموعة غشاء ، وتظهر نوية أو أكثر . وبالنظر لهذه الخطوات نجد أنها هى نفس الخطوات فى الطور التمهيدى ولكنها معكوسة فى تتابع حدوثها وتحدث كل هذه التغيرات فى وقت واحد بالضبط فى كل من النواتين الشقيقتين واللتين لازالتا فى نفس سيتوبلازم الخلية الأم . وتشابه فى هذا الانقسام كل نواة ناتجة نواة الأم فى عدد ونوع الكروموسومات ولذا فهو واسطة لزيادة عدد الخلايا دون تغيير فى قدرتها الوراثية .

وفى الطور النهائى يبدأ انقسام السيتوبلازم وينتهى بانتهائه أو بعده بقليل ويتم ذلك بتكوين صفيحة خلوية ، تتحول فى النهاية الى صفيحة وسطى ، فى المستوى الاستوائى للخيوط المغزلية لتفصل كل من النواتين عن الأخرى ، وبذا ينقسم ستوبلازم الخلية الى قسمين متقاربين فى الحجم .
ويوضح الشكل المرفق مراحل الانقسام الغير مباشر للخلية (الانقسام الميتوزى) .



مراحل انقسام الخلية الغير مباشر (الميتوزى)
MITOSIS
centrioles
aster
nucleus
nucleolus
chromatin threads
طور السكون
A- Interphase
الطور التمهيدى
المبكر
B-Early prophase
chromosome
centriole
aster
remnants of nuclear membrane
achromatic figure or spindle
Early
Metaphase
C-Late prophase
centriole
spindle
chromosome
equator of spindle
daughter chromosomes
الاستوائى التام
E- Metaphase
الانفصالى الأول
F- Early Anaphase
الطورالانفصالى النهائى
chromosomal fibres
G- Anaphase
interzonal fibres
chromatin threads
الطور النهائى
H- Telophase
centriole
daughter cells
nucleus
New cells

٣ - الانقسام الاختزالي
MEIOSIS

التكاثر الجنسي في النباتات يشمل تكوين جاميطات مذكرة وأخرى مؤنثة (حبوب لقاح وبيضات في النباتات الزهرية) ، أما في الحيوانات فتوجد أيضا الجاميطات المذكرة والمؤنثة (الحيوان المنوي والبويضة) وتحتوي كل جاميطة على نصف عدد الكروموسومات الموجودة في الخلايا الجسمانية للنبات أو الحيوان ، أي أنه يحدث انفصال لكل كروموسومين مكونين لكل زوج متماثل في المجموعة التي كانت بالزيجوت .

وتتم عملية الانقسام على مرحلتين أساسيتين الأولى اختزالية والثانية عبارة عن انقسام غير مباشر لكل نواة مختزلة ، وبذا يتكون أربع نويات تحتوي كل منها على عدد الكروموسومات الجاميطي وفيما يلي خطوات الانقسام في المرحلتين :-

أ- الطور التمهيدي الأول : PROPHASE I

تتميز فيه النواة بوجود الغشاء النووي والنوية في جميع خطواته المختلفة التي تختص كل منها بظواهر متتابعة أكثر تعقيدا منها في الانقسام الغير مباشر وتتلخص خطواته فيما يلي :

١- القلادي : Leptotene

تظهر فيه الكروموسومات رفيعة طويلة مفردة وكأنها غير منقسمة على طولها الى كروماتيدتين لكل كروموسوم كما في الانقسام الغير مباشر ، كما أن تركيبها يكون محددا تماما .

٢- التزاوجي : Zygotene

يلتصق في هذه الخطوة كل كروموسوم بقرينه عند الأطراف أو عند السنترومير بقوة التجاذب المتبادلة بينهما ثم يمتد ذلك الازدواج على طول الكروموسومين بدون اندماج ، وتكون الكروموسومات قبل التزاوج في أطول حالاتها ، وخلال اتمام هذه العملية تبدأ الخيوط في القصر والازدياد في السمك .

٣- الضام : Pachytene

تظهر فيه الكروموسومات قصيرة وغليظة وأكثر وضوحا منها في الخطوات السابقة وبسبب الازدواج الذي حدث في الخطوة السابقة يبدو العدد نصف عددها الأول ، وتعرف كل وحدة منها بالوحدة الثنائية bivalent ويكون كروموسومي كل وحدة أكثر ترابطا ببعضهما ولا ترتبط الوحدات الثنائية ببعضها البعض وفي أواخر هذه الخطوة يظهر

كل كروموسوم بحالة زوجيـــة وبذا يظهر بالوحدة أربعة خيوط أى أربع كروماتيدات علما بأنه لم يحدث انشقاق الكروموسومات فى هذه الخطوة وظهور هذا الازدواج فى كل كروموسوم ماهو الا اظهارا لحالة الازدواج التى كانت مختفية فى الخطوات السابقـة .

٤ ـ الانفراجى : Diplotene

تبدأ فيه الكروميتدات فى الانفراج عن بعضها البعض نتيجة للتنافر بينها ولكن لا يتم الانفراج الكلى .

٥ ـ التشتتى : Diakinesis

تتشتت فى هذه المرحلة الوحدات الكروموسومية (وتظهر أكثر اندماجا) داخل النواة وتقرب من الغشاء النووى ولا زال كل كروموسوم متصلا بشقيقـــه وتزداد الوحدات الكروموسومية فى الانكماش فى الطول وتسمك كما تأخذ النوية والغشاء النووى فى الاختفاء حتى يزولا تماما وبذا تخرج الوحدات الكروموسومية الى السيتوبلازم .

ب ـ الطور الاستوائى الأول : METAPHASE I

تبدأ فيه الخيوط المغزلية فى التكوين وتأخذ الوحدات الكروموسومية فى الانتظام والترتيب فى المستوى الاستوائى . ويتجـه فى كل وحـدة سنترومير أحد الكروموسومين الى أحد القطبين والآخر الى القطب الثـانى وبذا تظهر الوحدات الكروموسومية موزعة بانتظام فى قرص دائرى اذ انظرنا اليها من جهـة أى من القطبين ، ويسهل العد فى هذه الحالة .

جـ ـ الطور الانفصالى الأول : ANAPHASE I

يتم فيه انفصال كل كروموسوم عن مثيله نتيجـة لتحرك السنتروميرات الى القطبين المتقابلين ، وعند تمام وصول كل مجموعة الى القطب المتجهة اليه تكون كتلة واحدة مندمجـــة ، وينتهى هذا الطور بمجرد بدء تكوين الغشاء النووى حول كل كتلة .

د ـ الطور النهـائى الأول TELOPHASE I

يتم فيه تكوين الغشاء النووى وما يحدث بــه مشابه لمثيله فى الانقسام الغير مباشـر ، وقد تدخل النواتان الناتجتان وتمرنان فى هذه الحالـــة بالثنائيتان ، وتحتوى كل منهما على نصف العدد الكروموسومى فى دور السكون

أو قد يحدث الانقسام التالى غير المباشر فى الحال ولا زالت الكروموسومات مميزة كليا أو جزئيا أى بدون انقسام السيتوبلازم الى نصفين ٠

هـ ـ الطور التمهيدى الثانى : PROPHASE II

اذا لم يوجد طور للسكون محدد وبقيت الكروموسومات قصيرة منددمجة فان الطور النهائى الأول للانقسام الاختزالى يمر غير مميز الى هذا الطور أما فى الكائنات التى تنحل فيها الكروموسومات وتصبح غير مميزة فى الطـور النهائى الأول لدخولها فى طور السكون فان هذا الطور التمهيدى الثانى يبدأ بظهور الكروموسومات بالتالى وفى كلا الحالتين تظهر الكروموسومات فى النهاية سميكة مندمجـة وأكثر وضوحا ، ويمكن تمييز الكروماتيدتين لكل منها متباعدتين عن بعضها البعض كما لو كان بينها تنافر ولا يصل بينها الا السنترومير كما يظهر فى نهاية هذا الطور خيوط مغزلية فى كل خلية من خلايا الثنائيات ٠

و ـ الطور الاستوائى الثانى : METAPHASE II

ترتب فيه سنتروميرات كروموسومات كل مجموعـة فى المستوى الاستوائى للخيوط المغزليـة الجديدة ، وتكون الكروموسومات أطول منها فى الطور الاستوائى الأول ٠

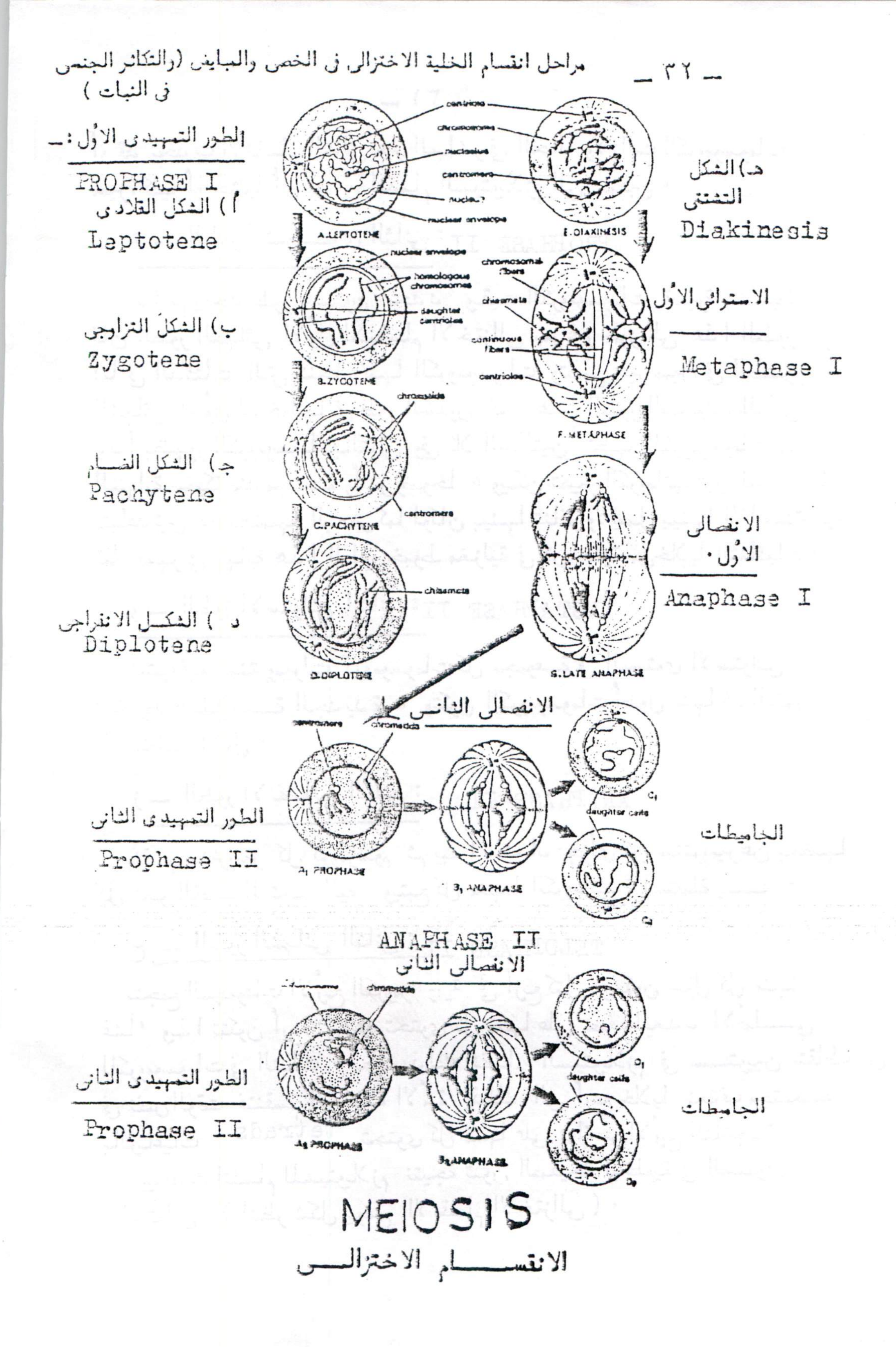
ز ـ الطور الانفصالى الثانى : ANAPHASE II

ينقسم سنترومير كل كروموسوم ثم يبدأ ابتعاد جزأى كل سنترومير عن بعضها كل نحو القطب المتجه اليه ويتبع كل منهما الكروماتيدة المتصلة بـه ٠

ح ـ الطور النهائى الثانى : TELOPHASE II

تتجمع المجموعات الأربع الكروموسومية فى أربع كتل ويتكون حول كل منها غشاء وبذا تتكون أربع نويات تحتوى كل منها على نصف العدد الأصلـى للكروموسومات فى النبات ، يعقب ذلك انقسام السيتوبلازم فى مستويين متقاطعين فى نفس الوقت فتنقسم الخلية الأمية بذلك الى أربع خلايا تعرف مجتمعة بالرباعيات tetrads تحتوى كل منها على نواة من الأربع الناتجـة ٠

ويحدث انقسام للسيتوبلازم نتيجة تكون الصفيحة الخلوية فى المستوى الاستوائى ٠ (انظر شكل يوضح الانقسام الاختزالى) ٠


مراحل انقسام الخلية الاختزالى فى الخصى والمبايض (والتكاثر الجنسى فى النبات)
الطور التمهيدى الأول :ـ
PROPHASE I
أ) الشكل القلادى
Leptotene
ب) الشكل التزاوجى
Zygotene
جـ) الشكل الضام
Pachytene
د) الشكل الانفراجى
Diplotene
هـ) الشكل التشتتى
Diakinesis
الاستوائى الأول
Metaphase I
الانفصالى الأول .
Anaphase I
centrioles
chromosomes
nucleolus
centromere
nucleus
nuclear envelope
A.LEPTOTENE
E.DIAKINESIS
homologous chromosomes
daughter centrioles
B.ZYGOTENE
chromosomal fibers
chiasmata
continuous fibers
F.METAPHASE
chromatids
centromere
C.PACHYTENE
D.DIPLOTENE
G.LATE ANAPHASE
الانفصالى الثانى
chromatids
الطور التمهيدى الثانى
Prophase II
daughter cells
الجاميطات
ANAPHASE II
الانفصالى الثانى
daughter cells
الطور التمهيدى الثانى
Prophase II
الجاميطات
MEIOSIS
الانقســـام الاختزالـــى

بسم الله الرحمن الرحيم

أدوات فحص التحضيرات البيولوجية

أجهزة ووسائل فحص التحضيرات

يشمل هذا الباب دراسة وسائل وفحص التحضيرات المعملية التى تعد داخل معامل الميكروتكنيك ، وذلك باجراء الفحص النظرى ، أو الفحص مع الرسم ، أو استخدام التصوير العلمى للعينة المحضرة وأهم تلك الوسائل ، الميكروسكوب الضوئى العادى والمركب ومشتملاته وكذلك الميكروسكوب الالكترونى والتجهيزات الخاصة به ، بالاضافة الى بعض الأدوات المساعدة فى عملية الرسم والتصوير التى ستذكر فى مواقعها

الميكروسكوب

THE COMPOUND MICROSCOPE

من المعروف أن المقصود بالميكروتكنيك هو الدراسة الدقيقة لمكونات الخلية فى الكائن الحى أو لدراسة أنسجة هذا الكائن سواء كان حيوان أو نبات أو دراسة المكونات الدقيقة للمواد المختلفة لدراسة شكل البللورات مثلا كما فى دراسة التركيب البللورى للسكريات ، ويمكن أن نطلق عليه علم الفحص المجهرى أو الميكروسكوبى ، اذ أنه باكتشاف الدقة المتناهية فى الفحص المجهرى بالميكروسكوب الالكترونى أمكن دراسة دقائق المادة ، مع ظهور أشعة الليزر وماتلى ذلك من تقدم فى علوم الفضاء لكشف أسرار الكون وقدرة الله سبحانه وتعالى .

Light Microscope.

الميكروسكوب الضوئى

يتركب الميكروسكوب الضوئى (شكل ١) من جزئين رئيسين هما :

أولا : القاعدة أو القدم : جزء صلب ثقيل يرتكز عليه الميكروسكوب أثناء الاستعمال ويساعد على الفحص باستعمال الاضاءة الصناعية فى الأنواع

المركبة والمستخدمة فى التصوير (شكل) .

ثانيـــــا : الذراع أو العمود : Pillar or Arm

ويتصل اتصالا مفصليا بالقاعدة وهو مقوس فى جزئه السـفلى بطريقة يسهل معها حملـه من مكان الى آخر وخاصة فى الأنواع التى تستخدم فى العملية التعليمية ، (شكل) ويحمل هذا الذراع فى جزئه العلوى جسم المجهر (جهاز العدسات) ويحمل فى جزئـه السفلى مائدة المجهر ، والمكثف ، والمرآة (جهاز التحكم فى الضوء) .

أ ـ الجسـم : The Body وهو محمول على الجزء العلوى من الذراع يتحرك عليه لأعلى ولأسفل بواسطة نوعان من الضوابط هما :

١ ـ الضابط الكبير : Coarse Adjustment

ويعرف أيضا بالمعدل الكبير وهو عبارة عن مسمار محوى وموجود فى ، المنطقة العلوية لعمود المجهر وتحريكه يتحرك جسم الميكروسكوب حركة واضحة ملموسة .

٢ ـ الضابط الدقيق: Fine Adjustment

ويعرف بالمعدل الصغير وهو موجود أسفل الضابط الكبير و هو أيضا عبارة عن مسمار محوى كسابقه الا أنه أصغر حجما وبتحريكه يتحرك جسم الميكروسكوب حركة صغيرة غير ملموسة . ووظيفة هـذه الضوابط هى التحكم فى المسافة بين التحضير (الشريحة) والعدسة الشيئية لكى تظهر الصورة واضحـة اذ أن لكل نوع من تلك العدسات الشيئية مسافة معينة بينها وبين التحضير تكون عندها الصورة أوضح مايمكن من حيث الرؤية للتحضير الموجود على الشريحة .

ويلاحظ أنه كلما قلت المسافة بين الشيئية والتحضير كلما دل ذلك على قوة تكبير أكبر للعدسة ، ويتكون جسم الميكروسكوب من الأنبوبـة المعدنية التى تضيق فى جزئها العلوى وتكون عريضة فى فى طرفها السفلى ،وتحمل العدسات العينية على طرفها العلوى والعدسات الشيئية على طرفها السفلى .

أ ـ العدسات العينية : ويوجد عادة منها مجموعة من تلك العدسات المختلفة فى قوة تكبيرها والتى يمكن تغييرها بنزع احداها ووضع أخرى محلها لتغيير قوة التكبير حسب الطلب ونوع الفحص .

ب ـ العدسات الشيئية : Ogjectives

وهى عبارة عن عدسات مثبتة على فتحات خاصة فى القطعة الأنفية التى توجد أسفل الأنبوبة والتى يمكن تحريكها حركة دائرية لتغيير عدسة شيئية بأخرى تختلف عنها فى قوة التكبير . ويراعى عند التغيير أن يكون محور العدسة العينية على استقامة محور الشيئية ، ولهذا صممت القطعة الأنفية بطريقة تحدث عند بلوغ الشيئية مكانها الطبيعى سماع صوت خفيف يشعر به الفاحص عند ادارة قرص القطعة الأنفية . والعدسات الشيئية أنواع :

١ ـ القوة الصغرى : Low power

والمسافة بينها وبين التحضير ١٦ مم أو مايقرب من ثلث بوصة وقوة التكبير ١٠ x .

٢ ـ القوة الكبرى : High Power

والمسافة بينها وبين التحضير ٤ مم أو حوالى $\frac{1}{16}$ من البوصة وقوة تكبيرها ٤٥ x .

٣ ـ العدسة الزيتية : Oil Immersion Objective

وهى ذات قوة تكبير كبيرة لا تستخدم الا فى الفحص الدقيق وتغمس فى الزيت (زيت السيدر) المستخرج من أشجار الأرز ، وفى حالة عدم توفر هذا النوع من الزيت يستخدم زيت البرافين ، والمسافة بينها وبين التحضير هى ٢ مم وتستعمل عادة لفحص البكتيريا ، وفى الفحص الدقيق وتحتاج الى ضوء شديد .

ب ـ المائدة وجهاز التحكم فى الضوء

١ ـ المائدة : Stage وهى عبارة عن قطعة معدنية مربعة الشكل عادة ذات فتحة فى منتصفها ومقابلة لكل من المكثف والشيئية لكى تمكن الضوء من النفاذ الى التحضير ويوضع التحضير على المائدة بطريقة أوتوماتيكية ، يمكن معها تحريك التحضير الى الأمام والخلف واليمين .

٢ ـ جهاز التحكم فى كمية الضوء :

أ ـ المرآة : Mirror وتوجد أسفل المائدة وفى نهاية الذراع مركبة بطريقة يمكن معها أن تتحرك حركة رأسية وأفقية ، وللمرآة

سطحان أحدهما مقعر والآخر مستوى ووظيفة المرآة عكس الضوء وتجميعه جزئيا خلال المكثف ومنه الى التحضير ٠

ب ـ المكثف : Condenser ووظيفته تجميع الأشعة الضوئية أثناء الفحص فى حزم كبيرة وحصرها حتى يتم مرورها من ثقب المائدة ويتحرك لأسفل ولأعلى بواسطة مسمار محوى كما يلحق بالمكثف حاجز للضوء (حاجز) ينظم شدة الضوء ومجموعة من الزجاج الملون ، يستعان بها فى هذا الصدد ٠

(الرسم الملحق يبين التركيب لكل من الميكروسكوب العادى والمركب لاحظ الفرق (فى المركب مصدر الضوء صناعى ويمكن تجهيزه للتصوير الميكروسكوبى بتوصيله بكاميرا من النوع ريفلكس سيتم توضيح ذلك فى الجزء الخاص بالتصوير ٠

طريقة استخدام الميكروسكوب:

١ ـ ضع الميكروسكوب على المائدة التى أمامك ويفضل أن يكون ثابت ولا ينتقل من مكان الى آخر منعا لتغيير وتلف العدسات كما يفضل أن يكون داخل علبة زجاج خاص به لحمايته من الأتربة التى قد تتلفه ـ قبل البدأ فى التعامل مع الميكروسكوب نظفه جيدا ٠

٢ ـ قرب الشيئية الصغرى للتحضير بانزال الأنبوبة بواسطة الضابط الكبير بحيث تصبح المسافة بين الشيئية والتحضير حوالى ٥ر١ سم من الخارج ، انظر خلال العينية وبواسطة الضابط الكبير ارفع الأنبوبة لأعلى وبالتدريج حتى نرى الصورة فى أوضح ما يمكن ، أتم عملية الرؤية بتحريك الضابط الصغير لأسفل ولأعلى بلطف ، داوم على تحريك الضابط الصغير طوال عملية الفحص حتى يمكنك رؤية كل مستويات التحضير ٠

٣ ـ اذا أردت الفحص بالقوة الكبرى ٠ أدر المرآة على سطحها المقعر واضبط كمية الاضاءة ثم غير الشيئية الكبرى ، حل الصغرى وبواسطة الضابط الصغير فقط أحكم الرؤية ولا تستعمل الضابط الكبير اطلاقا حتى لا تنكسر الشريحة ٠

٤ ـ بعد انتهاء الفحص اترك المجهر مستعملا على القوة الصغرى

ثم نظف العدسات ثم المائدة ثم أرجع الميكروسكوب داخل الصندوق أو يوضع تحت غطاء مناسب منعا للاتربة أو التلف أو الكسر .

بعض الملاحظات والارشادات يجب مراعاتها عند استعمال الميكروسكوب :

١ ـ تأكد من نظافة العدسات العينية والشيئية ويستعمل الزيلول فى عملية التنظيف ، ولاتستعمل الكحول لانه يذيب المادة المضوية اللاصقة لعدسات الميكروسكوب .

٢ ـ فى حالة التحضير الدائم يجب التأكد أن الشريحة فى الوضع الصحيح أى يجب أن يكون الغطاء متجها الى جهة العدسة الشيئية لأعلى .

٣ ـ اجعل كلتا عينيك مفتوحتان أثناء الفحص .

٤ ـ استعمل ضوء كاف بقدر الامكان ويفضل الضوء الطبيعى البحرى . الاتى من الشبابيك البحرية بحيث لايؤذى العين ولاتستعمل أشعة الشمس المباشرة (حتى لاتتلف شبكية العين)) ، وفى الميكروسكوب الضوئى المركب والمستعمل فى التصوير العلمى يستخدم مصدر ضوء كهرائى مناسب ، وكذلك فى حالة استخدام القوة الكبرى والزيتيةيستخدم ضوء صناعى قوى (انظر الميكروسكوب الضوئى المركب) .

٥ ـ استخدم الوجه المسطح للمرآة عند الفحص بالقوة الصغرى والوجه المقعر مع الشيئية الكبرى .

٦ ـ يجب أن يكون التحضير شفافا عند الفحص ، ويتوقف هذا على مقدرة الفنى على استخدام الوسائل التى ستشرح فى هذا الكتاب لكى يمكنه من اعداد " شريحة علمية " .

٧ ـ لكى يظهر التحضير فى الوضع العادى يجب أن يكون معكوس فى وضعه تحت الميكروسكوب .

طريقة ايجاد قوة التكبير فى الميكروسكوب : ـ

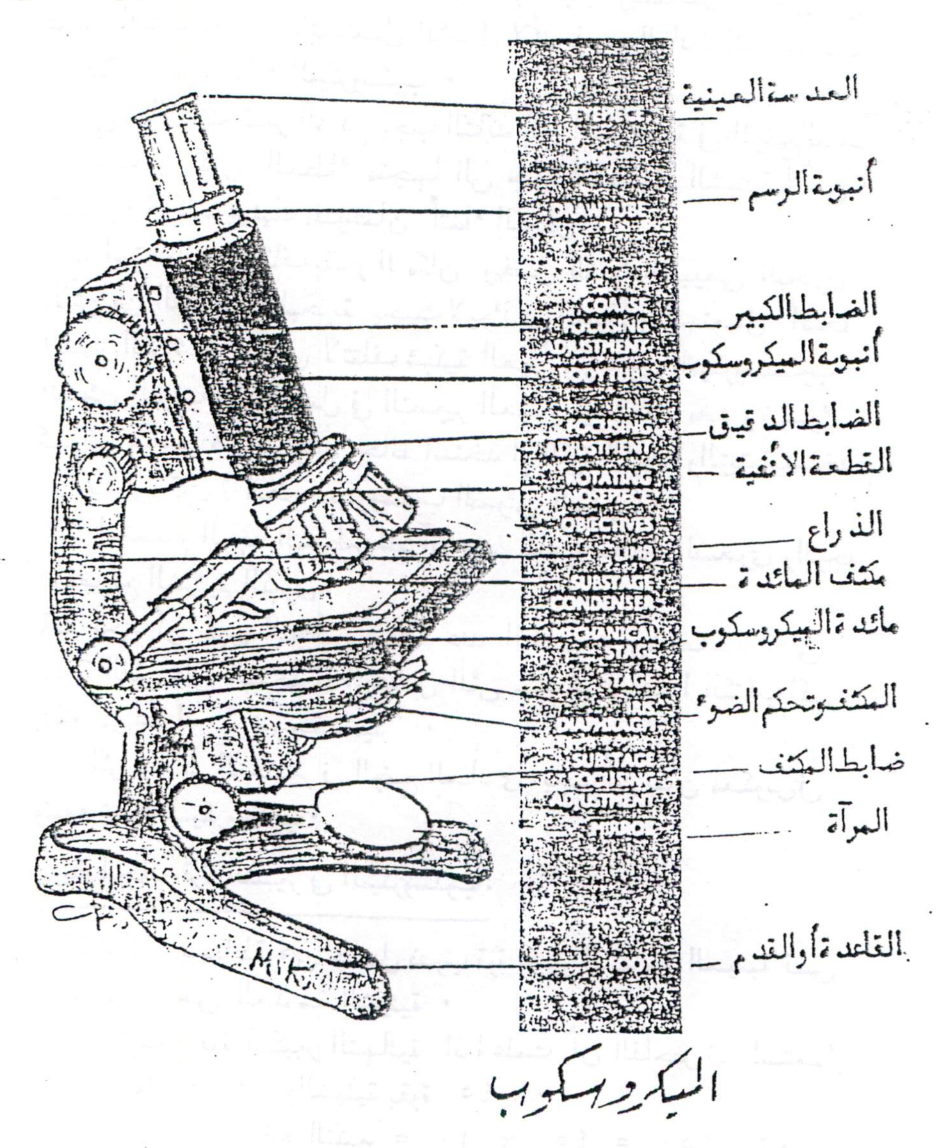
قوة التكبير ببساطة هى حاصل ضرب قوة تكبير العدسة العينية فى القوة المكتوبة على العدسة الشيئية .

مثال : أوجد قوة التكبير النهائية اذا علمت أن الفاحص قد استعمل العينية بقوة ١٠ × والشيئية بقوة ٤٥ × .

قوة التكبير = ١٠ × ٤٥ = ٤٥٠ مرة .

THE LIGHT MICROSCOPE

الميكروسكوب الضوئي العادي

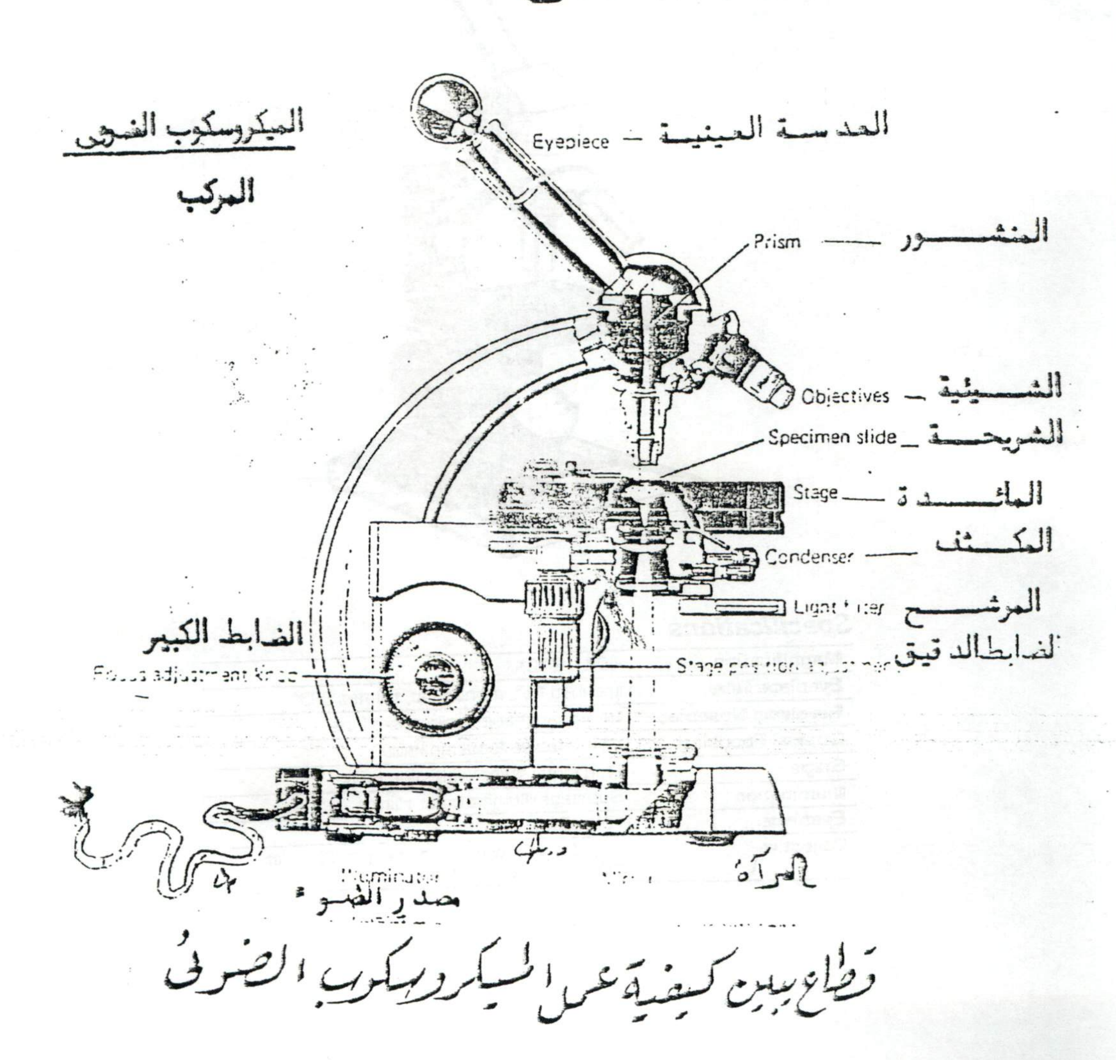


الميكروسكوب

عدسة شيئية عليها قوة التكبير

Plan 25/

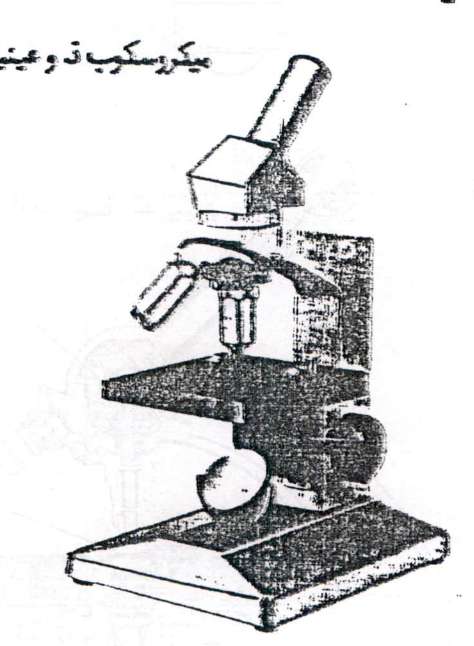
الميكروسكوب الضوئي المركب



قطاع يبين كيفية عمل الميكروسكوب الضوئي

Monocular Microscope

ميكروسكوب ذو عينية واحدة



Specifications

Magnification	40X—900X
Eyepiece Tube	Inclined 45°, monocular, rotates 360°
Revolving Nosepiece	Interchangeable triple nosepiece
Coaxial Focusing	With precise focusing knob
Stage	Horizontal stage with slide clips
Illumination	Substage illuminator or mirror
Eyepiece	10X, 15X
Objective	4X, 10X, 40X with safety device, 60X with safety device (optional)

Classroom Microscope



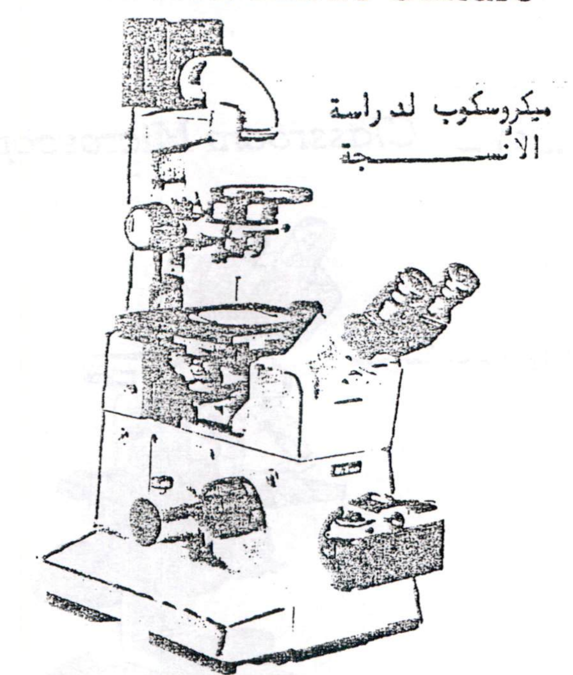
میکروسکوب ذو عینیتان

Model YS-T

Specifications

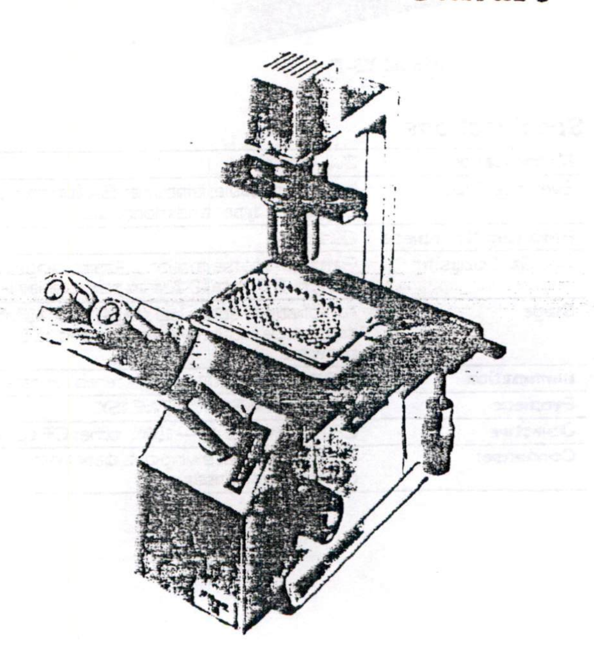
Magnification	20X — 1500X
Eyepiece Tube	Interchangeable; binocular BA (prism type), BC (mirror type) and monocular
Revolving Nosepiece	Quadruple
Coaxial Focusing	Range of coarse motion: 19mm; range of fine motion: 2.65mm (0.22mm per rotation)
Stage	Attachable mechanical stage, 76 x 40mm cross slide motion vernier reading to 0.1mm provided
Illumination	100/120/220V-20W precentered tungsten lamp
Eyepiece	CFE5X, CFWE10X, CFWE15X
Objective	CF E achromat 4X—100X, other CF objectives
Condenser	Abbe, achromat swing-out, dark field, phase contrast condenser

For Research Tissue Culture



ميكروسكوب لدراسة الانسجة

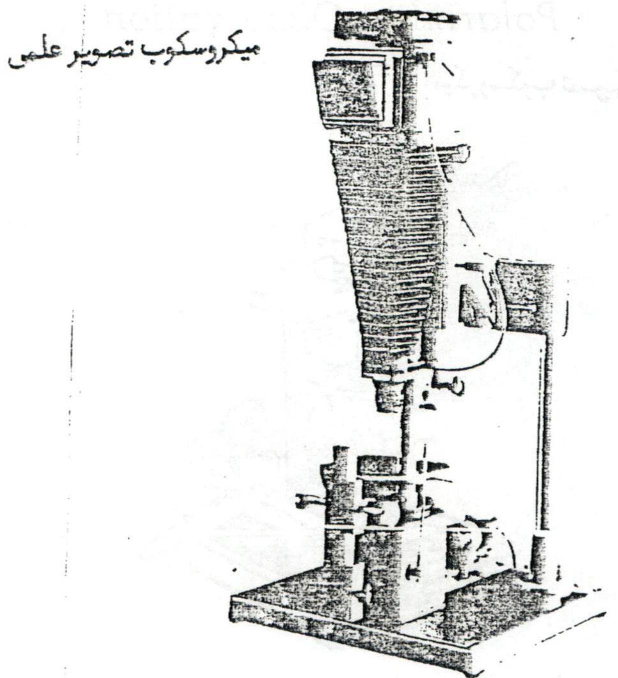
For Routine Tissue Culture



MULTIPHOT

For Macro/Micro Photography

ميكروسكوب تصوير علمى



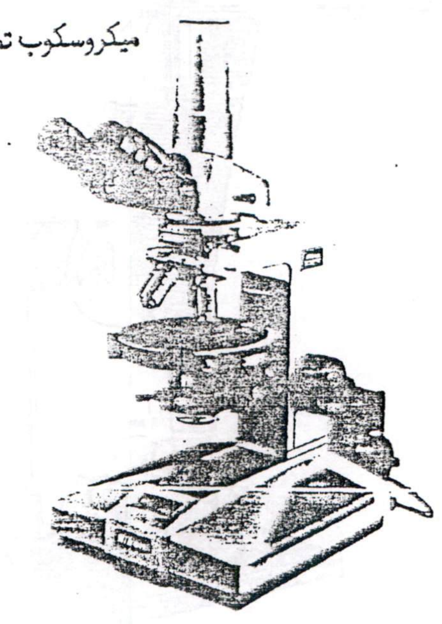
Specifications

Magnification	1/3X—40X (35mm), 1X—40X (4" × 5")
Stand	Used as a stand for photomicrography, copying and close-ups in addition to photomicrography, guide rail removable
Macro Lens	Macro Nikkor 120mm f/6.3, 65mm f/4.5, 35mm f/4.5, 19mm f/2.8
Diascopic Illumination	Tungsten lamp 6V-30W, 135mm dia. of diascopic illumination range, oblique illumination possible
Condenser	5 types available for each Macro Nikkor lens
Shutter Reflex Housing	No.1 shutter, ever-set type, no shutter cocking necessary, speed: B—1/125 sec. with X sync terminal
Bellows	3 types available: 60—600mm for 4" × 5", 40—300mm and 60—600mm for 35mm
Accessories	Microflex holder, Copying device, Episcopic illuminator stand, Universal illuminator, Lieberkuehn mirrors, Half mirror attachments, Spot photometer, 7X magnifier

OPTIPHOT-POL

For Research
Polarizing Observation

میکروسکوب تصویر علمی (بیونکلر)



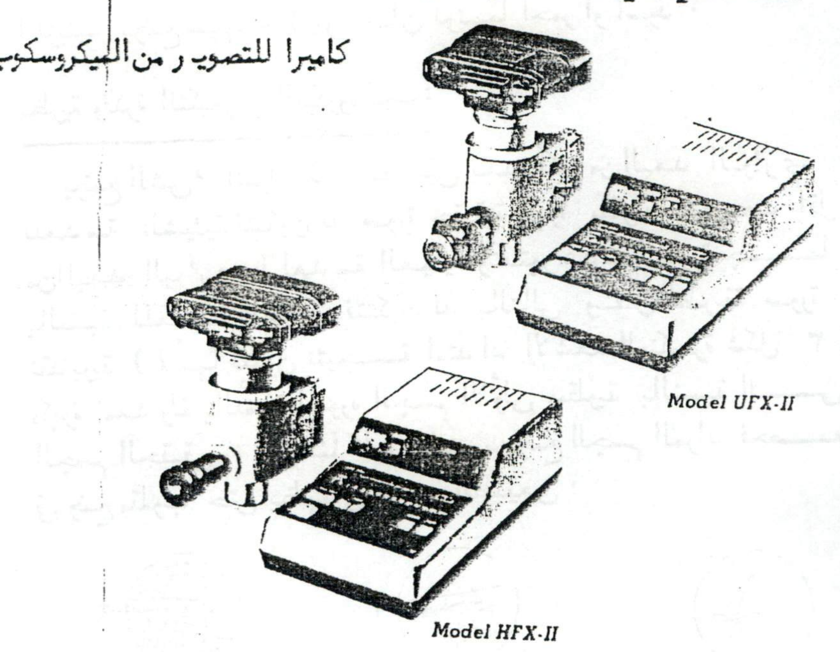
Specifications

Magnification	40X—1000X for observation
Eyepiece Tube	Interchangeable: trinocular TP, binocular BP and monocular AP; all with built-in Bertland lens: 1X magnification factor
Intermediate Tube	Built-in analyzer rotatable 180° with depolarizer
Revolving Nosepiece	Interchangeable, centerable quadruple
Coaxial Focusing	Range of coarse and fine movement: 30mm, coarse movement: 4.7mm per rotation; fine movement: 0.1mm per rotation with 1μ increment
Stage	160mm dia. circular graduated stage, click stops at every 45° from any position; universal stage acceptable
Illumination	Koehler system: centerable 12V-50W halogen lamp
Eyepiece	CFW10XCM with cross lines and micrometer
Objective	CF P achromat, CF M plan DIC achromat
Others	Detachable polarizer, click stops at 0°, compensators (tint and 1/4λ plate, Sénarmont, quartz wedge), epi-illumination possible

MICROFLEX

Photomicrographic Equipment

كاميرا للتصوير من الميكروسكوب



Model UFX-II

Model HFX-II

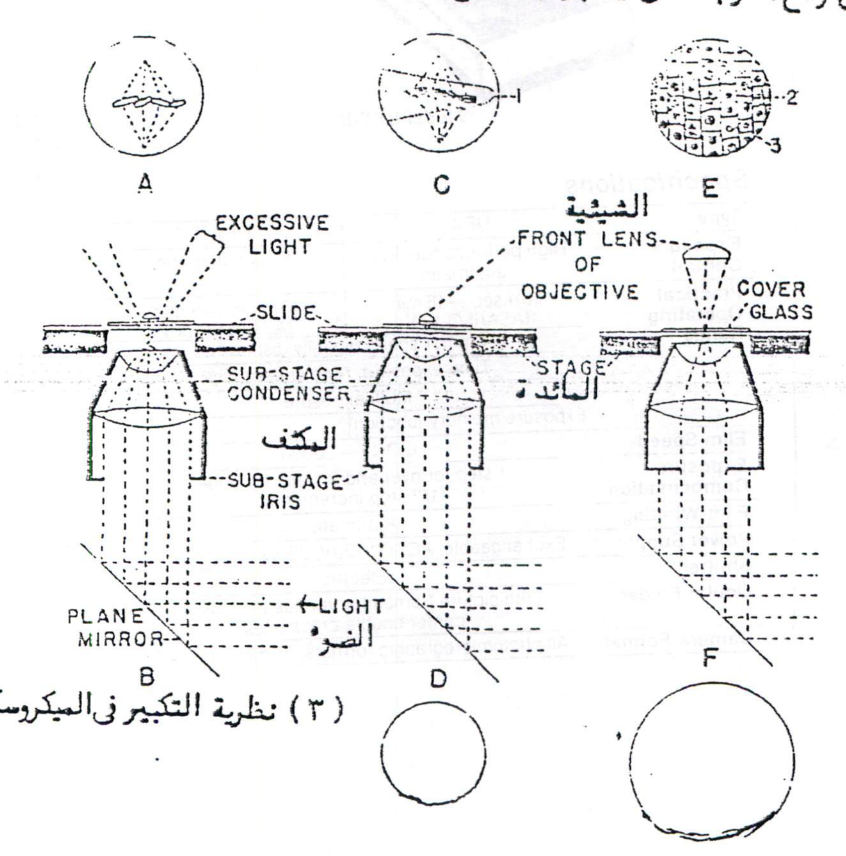
Specifications

Type	UFX-II	HFX-II
Exposure Control	High-performance, Fully automatic	Fully automatic
Practical Operating Range	10 msec.—16 min. (ASA/ISO 100);	10 msec.—3 min. (ASA/ISO 100);
	Shutter speed digitally displayed	
	Time exposure, Auto shutter lock	
	Multi-exposure	
	Exposure memory function	—
Film Speed	ISO 12—20000	
Exposure Compensation	1 step for over and 2 steps for under (1/3 step increments)	
Film Winding	Automatic	
Power Supply	Exchangeable; AC 100/120V, 220/240V, 50/60 Hz	
Shutter	Electric	
Ocular Finder	With picture frames for various formats and center double cross lines	
Camera Format	All photomicrographic formats, 35 mm to 4″ × 5″	

وتدل العلامة x على قوة التكبير وتكون دائمامكتوبة على العدسات سواء منها العينية أو الشيئية ، كما أن العدسات الزيتية يوضع عليها خط أو خطان لونهما أحمر أو أسود .

نظرية وفكرة التكبير فى الميكروسكوب:

يوضع الشيء المراد فحصه على بعد أكبر من البعد البؤرى للعدسة الشيئية فتتكون له صورة حقيقية مكبرة مقلوبة على بعد أقل من البعد البؤرى لالعدسة العينية وتعتبر هذه الصورة جسما بالنسبة للعدسة العينية فتتكون له بالتالي وبنفس الطريقة صورة تقديرية (لأنها تتكون نتيجة امتداد الأشعة المنكسرة شكل ٣) مكبرة معدولة بالنسبة لصورة الجسم الأولى ومقلوبة بالنسبة الى الجسم الحقيقى ، ومن هنا كان لابد من وضع الجسم المراد فحصه فى وضع مقلوب حتى يظهر فى الوضع الطبيعى .



(٣) نظرية التكبير فى الميكروسكوب

أجهزة الرسم من الميكروسكوب:

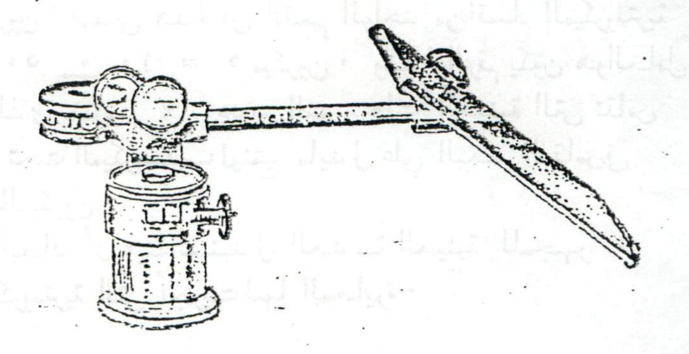
ان رسم التحضيرات الميكروسكوبية ذو أهمية علمية عظيمة حتى مع ظهور التقدم فى وسائل التصوير وذلك لاظهار التفاصيل التى لا تظهر بوسائل التصوير ، ويستخدم لذلك الرسم اليدوى على أن يستخدم وسائل أهمها :

١_ الكاميرا الناسخة (كاميرا لوسيدا) :

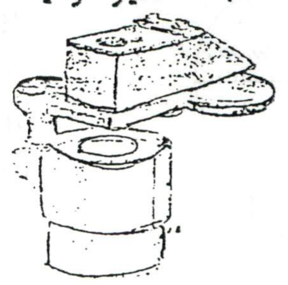
وهى عبارة عن عدسة عينية بها عدة منشورات ومرآة يمكن عنها مشاهدة القلم المستخدم فى الرسم عندما يرسم التحضير الذى يراه الباحث من تحت الميكروسكوب (شكل ٤ أ) .

٢_ الكاميرا الموضحة : (متغيرة الزوايا) :

تشبه كاميرا لوسيدا ويستخدم بدلا من المرآة حجرة توضع بزوايا مختلفة لتوضيح القلم الذى يستخدم فى الرسم (شكل ٤ ب)



(شكل ٤ أ) كاميرا لوسيدا

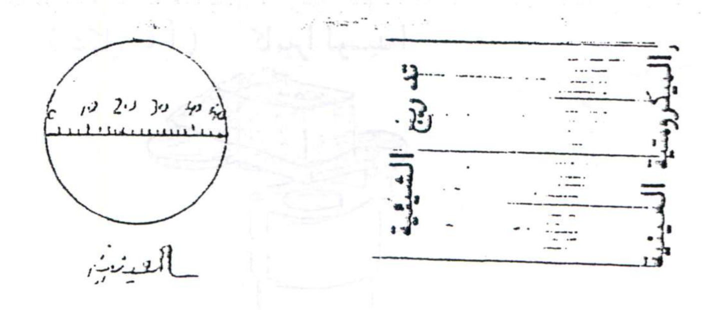


(شكل ٤ ب) الكاميرا الموضحة

طريقة قياس التحضيرات تحت الميكروسكوب :

يستعمل لهذا الغرض العينية الميكرومترية وتعتبر هذه الطريقة من أبسط وأسهل طرق القياس وهى عبارة عن شريحة مستديرة مقسمة تقسيما ميكرومتريا تدخل هذه الشريحة ووجهها الى أسفل فى عينية المجهر ثم نرى التدريج بواسطة العدسة الخارجية للعينية للتأكد من استقرار الشريحة الميكرومترية • توضع الشريحة الميكرومترية على مائدة الفحص للميكروسكوب ثم ينظر اليها من خلال العينية التى بها التدريج الميكرومترى لمحاولة تطابق حدود القراءات على بعض ثم يقدر ، كم تدريجا من الشيئية يساوى قسما واحدا من العينية ثم يحسب معاملا حسابيا ، يجرى ضربه فى عدد التدريجات العينية الميكرومترية التى يقاس بها بعد عينية ما ، لمعرفة مقدار هذا البعد المقاس بالميكرون باستعمال عدسة عينية ذات قوة تكبير معينة • فمثلا عند استعمال عدسة عينية قوة تكبيرها ٥ x اذا كان عدد أقسامها ١٠ تتطابق مع ٥ أقسام من الشيئية أى ٥٠ ميكرون فمعنى هذا أن القسم الواحد من أقسام الميكرومترية العينية = ٥٠ ÷ ١٠ = ٥ ميكرون • وهذا الرقم يكون هو العامل الميكرومترى الذى يضرب x عدد التدريجات العينية التى تقاس بها أى عينة تحت الميكروسكوب لينتج ما يدل على البعد المقاس فى تلك الحالة بالميكرون •

ولقياس أبعاد أى عينة تستبدل العدسة العينية للمجهر ، بالعينية الميكرومترية التى أجريت لها المعايرة •



كيفيـــة عمل الميكروسكوب الالكترونى :

ومن الممكن فهم تلك المبادىء الأساسية التى بنيت عليها فكرة الميكروسكوب الالكترونى وذلك بالنظر الى المعادلـة التالية :ـ

$$R = \frac{K \times \lambda}{NA}$$

حيث K مقدار ثابت = ٦١ر٠

و λ هو طول الموجـة للشعاع الالكترونى المعامل تحت ٦٠ كيلـو فولت ويساوى حوالى ٠٠٠٥ر٠ nm (نانوميتر) حيث تعطى قوة تخلل عالية للعينة . High theoratic resolution

و N.B هى Resolution technique وهى عبارة عن طريقــــة استخدام الميكروسكوب الضوئى للحصول على عدد كبير من ال bands أو المساحات المظللة فى النسيج وتستخدم فى تقسيم الكروموسومات فى الانسان الى أنواع مختلفة تبعا لعدد ال bands الموجودة فى كل كروموســـوم ولها القدرة على اظهار أكثر من ٥٠٠ bands (مساحة مظللة) فــى الكروموسوم الواحد .

بينما NA تعرف بأنها دالة الانعكاس Refractive index (n) وهى قياس الكثافة الضوئية Optical density للمادة الملحوظة بــين التحضير المجهرى والواقع مضروبا فى جيب (sine) الزاوية النصفيـــة لثقب العدســـة (u) :

$$NA = n \times \text{sine } u$$

ويعتمد الميكروسكوب الالكترونى على فكرة (مبدأ) انحراف الشعاع الالكترونى فى وســط كهرومغناطيسى بطريقـــة مشابهة لانحراف الشعاع الضوئى العادى بواسطة عدســـة زجاجيــــة .

ويمكن الحصول على الالكترونات بواسطة درجة حرارة عالية ناتجة مـــن

تسخين فتيلة معدنية (كاثود Cathode) في وسط مفرغ من الهواء (Vacuum) تنبعث الالكترونات ثم تعرض لفرق جهد يعادل ٦٠ - ١٠٠ كيلو فولت أو أكثر بين الانود والكاثود ، حيث أن الانود (Anode) عبارة عن صفيحة معدنية في وسطها ثقب (فتحة) صغيرة تزيد من سرعة مرور الالكترونات من الكاثود الى الانود نتيجة لفارق الجهد بينهما ومرور بعض من هذه الالكترونات من خلال الفتحة الوسطى في الانود في شكل شعاع الكتروني حيث يتم بعد ذلك انحرافها نتيجة لتأثير العدسات الكهرومغناطيسية التي تشبه الى حد ما تلك العدسات الزجاجية في الميكروسكوب الضوئي ، وبالتالي يقوم المكثف بتجميع الشعاع على العدسة الضوئية لتكوين صورة غير حقيقية للجسم .

هذه الصورة الغير حقيقية (image) يتم تكبيرها عن طريق عدسات اسقاط ويتم في نهاية الأمر اسقاطها على لوحة فلوروسنتية (لامعة) أو لوحة رقيقة فوتوغرافية (ضوئية) .

وتوضح الصورة في الشكل المرفق( ) ان الحصول على الأشعة الالكترونية تأتي من مصدر كهربائي بتسخين سلك elect-heated tungs وهو مايسمى بالكاثود Cathode يقع في قمة الانبوبة المفرغة تفريغا كاملا من الهواء التي تنطلق في هذا المجال الأشعة الالكترونية بقوة كبيرة في اتجاه الانود Anode الذي يوجد في وسطه فتحة ضيقة تسمح بمرور الالكترونات منها وتزيد من شدة سرعتها ويوجد الانود في مواجهة المكثف condenser والعدسة العينية وتوضع العينية بين المكثف والعدسة الشيئية (مغناطيسية) حيث توجه أشعة مغناطيسية تماثل الموجات (الأشعة) الضوئية في الميكروسكوب الضوئي وبعض الأشعة الالكترونية يمتص والبعض الآخر يتشتت scatter (تمر في القطاع) والأشعة التي تمر تعطى صورة تكبر وتستقبل على شاشة فلورسنتية موضحة fluorescent screen والعين لاتستطيع أن تميزا وتحس بالصورة الالكترونية ، وتعمل الشاشة على تجسيم هذه الصورة ، وللحصول على صورة دائمة للتحضير يتم أخذ صورة فوتوغرافية على الفيلم داخل كاميرا مركبة على الميكروسكوب الالكتروني .

Cathode
كاثود (قاذف ألكترون)
Anode
أنود (مستقبل ألكترونى)
Condenser
مكثف ألكترونى
العينة
Specimen (black dot)
Objective
الشيئة
المكبر
Projector
شاشة الميكروسكوب
Fluorescent screen
الميكروسكوب الألكترونى

L = Light source
Cond. = Condenser
Spec. = Specimen on slide
Obj. = Objective lens
Int. = Intermediate lens
Eye. = Eyepiece (top of scope)
Retina = Retina of eye or film

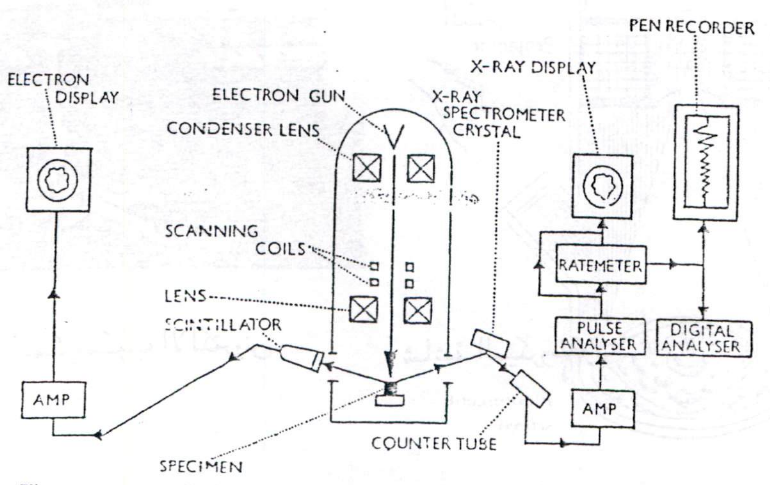
الميكروسكوب الالكترونى

L
Cond.
Spec.
Obj.
Int.
Eye.
Retina

Electron gun
Alignment system
Condenser lens with aperture
Specimen airlock
Objective lens and stigmator
Intermediate image aperture
Intermediate lens
Projector
Viewing microscope
Fluorescent screen
Valve block
Diffusion pump
Shutter
Specimen stage control
Automatic film advance
Automatic film numbering

Light Microscope

Electron Microscope



The components of the scanning electron-probe microanalyser (shown diagrammatically).

الميكروسكوب الالكترونى المجسم والمحلل للعناصر

طريقة عمل القطاعات للميكروسكوب الالكترونى :

يمكن الميكروسكوب الالكترونى أن يوضح العينات التى يصل قطر تقطيعها ٠٫٠١ الى ٠٫٠٥ u (ميكرون) ، ويجرى تثبيت تلك العينات فى ١ % محلول Osmium tetroxide ثم تجفف العينات فى مراحل متدرجة من الكحول ، ويلزم عند التثبيت بالمحلول Osmium tetroxide ضبط ال pH على درجة (٧٫٤) ، كما يمكن استخدام محلول الالدهيد وفى هذه الحالة لابد من معاملة النسيج فى المراحل الأخيرة بمحلول الأزموزيوم Solution of Osmium tetroxide ثم تجفيف العينات فى الكحول المتدرج من الضعيف الى الأقوى بدأ ب ٥٠ % ، ثم اجراء الطمر لعمل بلوكات التقطيع ، ويجرى الطمر فى البلاستيك ويمكن استخدام العديد من مواد الربط resins ولكن أكثرها استخداما هو " Araldite " أو " Epon ".... ويجرى التقطيع على سمك ٠٫٠٥ u ، والتقطيع يتم باستخدام ميكروتوم خاص تصنع السكينة من الزجاج أو الماس diamond ثم تنقل العينة بعد ذلك بكبسولة من النحاس لتوضع للفحص فى الميكروسكوب الالكترونى .

الحدود التى يستخدم فيها الميكروسكوب الالكترونى :

١ـ تتطلب طبيعة الميكروسكوب الالكترونى استخدام شعاع الكترونى فى وسط مفرغ (Vacuum) عالى وعينة (Section) غاية فى الدقة وهذه تعوق استخدام العينات الحية ، بالاضافة الى الفعل الضار للشعاع الالكترونى على العينة المستخدمة اذ قد يؤدى الى احداث تغييرات غير مرغوب فيها بنسيج العينة .

٢ـ يصعب تتبع التركيب النسيجى فى الخلايا المكونة لنسيج واحد لدراسة العلاقة بينها أو لدراسة العضو المكونة له .

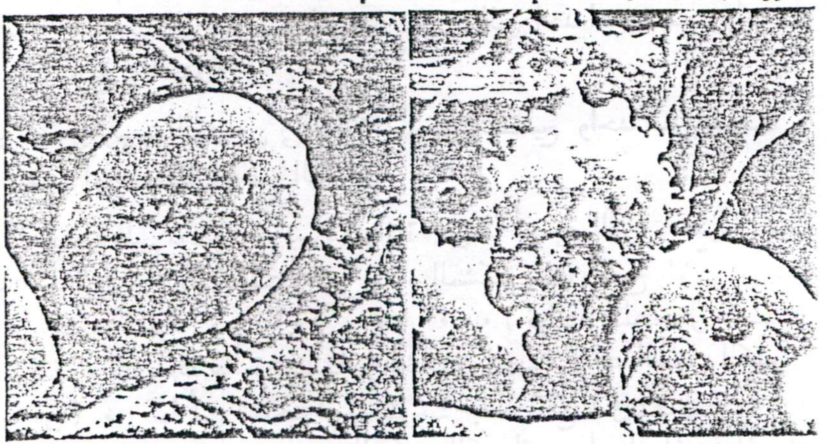
٣ـ لايمكن الحصول على معلومات كيماوية وافية عن الأنسجة التى تفحص بواسطة الميكروسكوب الالكترونى ، وقد حلت أخيرا هذه المشكلة فقد أصبح الآن من الممكن استخدام فروق جهد عالية ٥٠٠٠٠٠ ـ ١٠٠٠٠٠٠ فولت للحصول على الكترونات معجلة ذات سرعة عالية تمكنها من اختراق العينة ذات السمك الكبير (١ـ ٥ ميكرون) ، كما أن استخدام الميكروسكوب القاطع (Scanning) القدرة على مشاهدة الذرات . وتحديد التركيب الكيميائى بواسطة أشعة اكس .

٤ــ من الصعب فحص سطح القطاع فى النسيج المفحوص بالميكروسكوب الالكترونى وقد حلت هذه المشكلة باستخدام الميكروسكوب الالكترونى المجسم (القاطع)

الميكروسكوب الالكترونى المجسم (القاطع)
(SCANNING ELECTRON MICROSCOPY)

بدأ فى استعماله ١٩٦٣ وذلك لدراسة سطح الخلايا ودراسة الأنسجة الصلبة مثل النسيج الغضروفى ، والعظم والأسنان ويعطى صورة مجسمة أى ذات ٣ أبعاد ، ومصدر الأشعة الالكترونية كما فى الميكروسكوب الالكترونى الا أنها تزود بملف يكون طبقة من الأشعة الحارقة deflection layer بين العدسة الكهرومغناطيسية والعينية حيث تؤدى الى انحراف الشعاع الألكترونى وبالتالى فانه يتم اعتراضه بالعينية ويقوم بمسح نقطة فنقطة من العينية فى ترتيب وزمن محدد .

وتوضع العينة فى أسفل أنبوبة الميكروسكوب ، وعند انطلاق الأشعة الالكترونية فانها لا تخترق العينة ولكنها تنعكس ثانية بواسطة عاكس من الفوسفور كما أن العينة تكون سميكة نوعا ما (١ــ ٥ ميكرون) ، كما أنها تكون مغلفة بترسيب معدن فلذى ثقيل مثل الذهب على سطحها و بهذه الطريقة فان الشعاع الألكترونى المنبعث من الكاثود يطلق عليه الشعاع الأولى Primary beam ينعكس ثم يولد شعاع ألكترونى ثانوى Secondary beam عن طريق مولدات خاصة (ملفات) تجعله فى شكل متقطع كاشارات ألكترونية (electrical sign) يتم نقلها الى أنبوبة تلفزيونية (television tube) تعطى للعينة شكل أو صورة ذات ثلاثة أبعاد ، وقد أمكن استخدام هذا الميكروسكوب فى التصوير العلمى المستمر لدراسة بيولوجيا الخلايا والأنسجة وتسجيلها تليفزيونيا (انظر شكل يوضح صورة مجسمة لكرات الدم الحمراء فى دم الانسان .



Two scanning electron micrographs of erythrocytes. That on the left is of normal shape and the biconcave disc appearance is well seen; the blood corpuscle in the centre of the right-hand micrograph has become crenated due to loss of water.

4 μm.

الميكروسكوب الالكترونى المجسم والمحلل للعناصر

SCANNING ELECTRON-PROBE MICROANALYSIS

عند فحص العينة بواسطة الميكروسكوب الالكترونى المجسم (القاطع) فان أشعة X تنطلق . ان أشعة X هذه تخترق العينة . وكل عنصر كيماوى له القدرة على انتاج نوع معين من أشعة X rays ذات طول موجة معينة تختلف من عنصر الى آخر ، فاذا أمكن تحديد طول هذه الموجات لأشعة X rays يمكننا تحديد العناصر المكونة للنسيج وكذلك كميتها وموقعها فى النسيج أو العضو .

وفى هذا النوع من الميكروسكوبات يتم اختراق الشعاع الالكترونى للعينة كما يتم توجيه أشعة الكترونية أخرى لسطح العينة بواسطة ملف ثانوى فى منطقة أعلى العينة وفى مواجهة عدسات عينية مختلطة .

ان أشعة اكس X rays التى تنطلق من العينة أو تعكس تجمع وتحلل وتقدر كميتها وطول الموجات الخاصة بها بواسطة جهاز القياس الخاص

وتمرر أشعة اكس فى أنبوبة الجهاز المملوءة بالغاز ومتصلة بعداد الجهاز حيث تصدر موجات واشارات متقطعة يمكن منها تحديد نوع العنصر الذى يصدرها . كما يزود بأنبوبة تلفزيونية فوسفورية يمكن منها الحصول على صورة مجسمة للعينة فى نفس الوقت ، وذلك بتوصيل هذا الميكروسكوب بميكروسكوب ضوئى لتسجيل تلك الصور للعينات ، كما يمكن تزويده بالعدادات اللازمة لتسجيل العناصر الكيماوية وعددها ومسجلات للأشعة الصادرة من العناصر وكل مايستجد من اختراعات ، أى أنه ميكروسكوب المستقبل فى دراسة بيولوجيا وميكروتكنيك الخليـــة الحية .

الفرق بين الميكروسكوب الضوئى والالكترونى

١ـ التكبير الذى يتم الحصول عليه عن طريق العدسة الشيئية الخاصة بالمجهر الالكترونى يساوى مقدار ثابت (أو محدود) لايتغير بينما التغيير فى التكبير يتم عن طريق التغير فى الوسط المغناطيسى الخاص بالعدسات الممغنطة والتى تشبه العدسة الزووم أو العدسة العينية بالن بالنسبة للمجهر الضوئى •

٢ـ لابد أن يكون العينة المأخوذة من النسيج (Section) صغيرة جدا لأن الالكترونات من السهل أن تمتص أو تتشتت باصطدامها بالجسم ويتراوح عادة سمك العينة مابين ٠٫٠٢ ، ٠٫٠١ فى حالة الميكروسكوب الالكترونى ، بينما تكون ١٠ ــ ٢٠ ميكرون فى حالة الميكروسكوب الضوئى •

٣ـ يتم امتصاص أو تشتت الأشعة الالكترونية فى الميكروسكوب الالكترونى بواسطة المناطق ذات الوزن الجزىء العالى فى العينة ، بينما يتم امتصاص الضوء فى المجهر الضوئى بواسطة المناطق المصبوغة •

٤ـ فى المجهر الالكترونى الالكترونات المشتتة يتم امتصاصها بواسطة ثقب العدسة الشيئية حيث تقوم بترشيحها بعيدا بحيث لاتتدخل فى تكوين الصورة • وبالتالى تبدو المناطق التى تشتت الالكترونات منها كمنطقة (سوداء أو داكنة) ، وتعتمد قدرة الالكترونات المشتتة على الوزن الجزىء للعينة ، وبالتالى تستخدم المعادن الثقيلة كالرصاص واليورانيوم لتحميل عينات الأنسجة لتزيد التضاد وتعطى صورة أوضح •

بينما فى الميكروسكوب الضوئى تستخدم طريقة البرافين فى تحضير النسيج للفحص واستخدام الصبغ بالصبغات المختلفة لتمتص العينة الأشعة الضوئية لتعطى صورة واضحة •

٥ ـ يتميز الميكروسكوب الالكترونى بقدرته العالية على التكبير التى تزيد عن ٢٠٠ مرة قدر الميكروسكوب الضوئى ، بالاضافة الى اعطاء صورة مجسمة فى حالة الميكروسكوب المجسم (القاطع) ، كما يمكن معرفة التركيب الكيماوى للخلي من الميكروسكوب الالكترونى المجسم والمحلل لأشعة اكس•

وبصفة عامة يمكن عن طريق هذا الميكروسكوب الالكترونى الحصول على صو مكبرة ٢٥ ألف مرة ، يمكن أن تصل الى ٢٠٠ ألف مرة عند تكبير الصورة •

خطوات وطرق الميكروتكنيك

PREWIEW OF METHODS

فى تناول موضوع الميكروسكوب بنوعيه وفى موضوع الخلية كان الهدف هو الحصول على صورة واضحة للعينة والشريحة المحضرة وهذا يلزم التخصص فى عمليات التصوير العلمى مع خلفية لبيولوجيا الخلية ودراسة علمية لمختلف الكائنات الحية ، النبات والحيوان ، والهدف من عمليات الميكروتكنيك هو جعل التحضير أكثر شفافية ، ولهذا يستخدم كل الوسائل من تلوين الأنسجة النباتية أو الحيوانية والخلايا ومكوناتها وجعلها شفافة ورائقة حتى يمكن للضوء أو الأشعة الألكترونية أن تنفذ من خلالها ويمكن فحصها . والكائنات وحيدة الخلية مثل البكتيريا والفطريات والطحالب والبروتوزوا فى الحيوانات والأميبا والفلاجلم وغيرها هذه تكوينها بسيط وبالتالى يمكن فحصها دون الحاجة الى عمل قطاعات بها ، بعكس الكائنات عديدة الخلايا فان هذه لابد من عمل قطاعات بها مارا بالأنسجة المختلفة (نبات أو حيوان) وذلك باجراء التشريح اللازم لاستخراج العضو الذى سيجرى عليه عملية التحضير للفحص الميكروسكوبى ، وقد تستخدم طرق أخرى حسب طبيعة النسيج الذى يراد فحصه مثل طريقة السحبات ، السحق ، النقع ، الفصل أو باجراء التقطيع الى قطاعات ميكرونية دقيقة للأنسجة ، وهذه القطاعات لابد من التغلب على المشاكل التى تظهر من استخدامها بجعلها دقيقة تحتوى على عدد محدد من الخلايا رقيقة السمك تسمح بمرور الضوء من خلالها حتى تمكن من فحصها ومشاهدة مكوناتها . ونظرا لأن معظم الكائنات غير ملونة أو تحتوى على صبغات ولذلك يستخدم الصبغ فى عمليات الميكروتكنيك المختلفة يكون لها القدرة على صبغ أجزاء مختلفة من الخلية أو متخصصة فى صبغ مكونات معينة لتسهيل الفحص والتفريق .

والعينات التى يتم صبغها يلزم حفظها باستخدام مادة حافظة لها القدرة على المحافظة على القطاع من التلف أو التحضير من التغييرات التى تحدث بعد التحضير ، وأفضل مادة استخدمت فى عملية التحميل الدائم هى مادة (كندا بلسم) .

ان اعداد العينات للفحص الميكروسكوبى تمر بأربعة مراحل :
أ — التثبيت : وهو استخدام وسيلة تساعد على حفظ مكونات الخلية النباتية أو الحيوانية فى وضع أقرب اليه ماتكون وهى حية ، وتجهيزها لتقبل عمليات الميكروتكنيك وهو التحميل والتقطيع ..ألخ .
ب — التقطيع : بتقطيع الأعضاء النباتية أو الحيوانية الى أجزاء صغيرة ثم الى قطاعات دقيقة يسهل فحصها .
ج — الصبغ : يلى التقطيع ويمكن استخدام أكثر من صبغة .
د — التحميل : يجرى التحميل فى مادة حافظة مناسبة بعد المرور بعمليات مختلفة وأفضل الطرق هو استخدام كندا بلسم .

طرق اعداد وتجهيز العينات

TYPES OF PREPARATIONS

يوضح هذا الموضوع رسم صورة عامة للميكروتكنيك الميكروسكوبى مع التعريف ببعض الطرق المنتشرة الاستخدام فى النبات والحيوان على السواء :

ا — فحص العينات الحية الطازجة : Living Materials

ويتم فى هذه الطريقة فحص العينات الصغيرة الحجم وحيدة الخلية كما فى البكتيريا أو أن خلاياها واضحة مميزة مثل الفطريات والطحالب (فى النبات) ، أما فى الحيوانات وحيدة الخليــة م (البروتوزوا ، البراماسيوم ، الأميبا ، وغيرها ..) فهذه يمكن فحصها دون الحاجة الى اجراء قطاعات فيها ، كما تستخدم فى حالة فحص بعض الحيوانات البسيطة الخلايا مثل يرقات الحشرات والديدان المفلطحة والنيماتودا وغيرها ، أما فى النباتات والحيوان الراقية فيلزم اجراء التشريح للحصول على بعض الأجزاء لفحصــها طازجــة .

واستخدام الفحص الطازج يكون باستخدام محلول فسيولوجى منظم باستخدام الفحص أو التشريح فى وجود محلول ملحى يسمى Saline solution أشهرها هو محلول رنجر : Ringer's S
يتركب محلول رنجر الفسيولوجى من:

محلول رنجر: Ringer's Solution

كلوريد الصوديوم .... ٨٫٥ جم

كلوريد بوتاسيوم .... ٠٫٢٥ جم

كلوريد كالسيوم .... ٠٫٢٥ جم

بيكربونات الصوديوم .... ٠٫٢٥ جم

ماء مقطر .... لتر

وبصفة عامة يمكن تحضير المحلول الفسيولوجى المنظم من كلوريد الصوديوم فقط بنسبة تتراوح مابين ٧٫٥ جم /لترماء الى ٩ جم /لترماء .

وفى التحضيرات الطازجة يمكن الفحص باستخدام الصبغات التى تصبغ مكونات السيتوبلازم والتى سيأتى ذكرها .

٢- التحميل الجاف : Dry mounts

يمكن فحص التحضيرات الجافة وخاصة اذا كان التحضير غير سميك يسمح بنفاذ الضوء منه فيمكن فحصه بالميكروسكوب العادى أو استخدام ميكروسكوب التشريح (البينكلر) الذى يستخدم الضوء الساقط من أعلى مثل فحص هياكل الحيوانات البحرية أو فحص النباتات المصابة بالفطر أو البكتريا ، أو فحص أجنحة الحشرات والحراشيف الموجودة عليها ، وكذلك فحص جذور النبات أو الشعيرات النباتية وأسطح الأوراق .

٣- التحميل الرطب: Wet whole mounts

يستخدم فى تحضير العينات وتجهيزها كما هو الحال فى حالة البكتيريا أو الفطر أو حبوب اللقاح فى النبات أو استخدام التشريح اليدوى فى أجزاء النبات باستخدام شفرة حادة أو تحميل الكائنات الحيوانية الصغيرة (البراميسيوم ، الأميبا ، الفلاجيلم ، النيماتودا) وأجزاء مفصليات الأرجل وغيرها ، وهذه يلزم اجراء نزع الماء بواسطة الكحول ثم الترويق والصبغ ثم الغسيل لازالة الصبغة الزائد والتجفيف بالكحول ثم التحميل بمادة مناسبة (مثل استخدام الجلسرين جلى فى تحميل حبوب اللقاح) حتى لايتلف الخلايا بالكندا بلسم .

٤ ـ السحبات : Smears

تحضر بعمل فيلم دقيق على الشريحة أو الغطاء (الكفر) الكائنات التى يمكن تحضيرها وتحميلها بهذه الطريقة هى حبوب اللقاح الموجودة بخلايا النحل أو المجموعة بواسطة الشغالات ، جراثيم الأمراض الفطرية النباتية والحيوانية والبروتوزوا ، الدم ، والليمف ، الحيوانات المنوية ، محتويات القناة الهضمية ، المخلفات (البراز) ، الخلايا الطلائية للمهبل ، أى أنسجة طلائية رطبة والتى تحتوى على خلايا منفصلة كثيرة تنتشر على الشريحة لفحصها لدراسة تفاصيل التركيب الخلوى فى الحالة الصحية والمرضية . نسيج الخصية يحضر بطريقة السحبة لتحديد وجود أو عدم وجود ، الحيوانات المنوية به . وهذه السحبات تفحص اما بطريقة التحميل الجاف أو الرطب حسب النسيج الذى حضرت منه . وتمرر العينات فى التحميل بنظام السحبة بخطوات المعاملة بالكحول والصبغ والغسيل بالكحول ثانية للحصول على تحضير أكثر شفافية يمكن فحصه بكل دقة .

٥ ـ الهرس : Squashes

وتحضر العينات بوضعها فى محلول ملحى فسيولوجى على شريحة ثم تغطيتها بغطاء والطرق عليها برفق حتى يتم تفصيص مكونات العينة ، وتستخدم هذه الطريقة فى دراسة الكروموزومات الموجودة فى الغدد اللعابية لذبابة الدروسفلا . ويستعمل السحق فى هذه الحالة فى محلول تثل وتثبيت مع وجود الصبغة ويمكن اجراء التجفيف بالكحول والتحميل الدائم بعد ذلك مع ضرورة اجراء الترويق ليكون التحضير شفافا .

٦ ـ التفصيص : Isolations

فى يتم تفصيص الأنسجة المختلفة الى عدة جزيئات يسهل فحصها بواسطة استخدام السحق والتفصيل باستخدام التشريح الدقيق بابرة التشريح كما فى حالة الأنسجة الليفية أو فى حالة دراسة الخلية والهيئات وتكوين الجراثيم أو مكونات المبايض فى النبات والحيوان والخلايا العصبية ، تعتبر طريقة الفصل والتفصيص أحسن الطرق وكذلك فى أبحاث الهندسة الوراثية لفصل الخلايا وزرعها على البيئات الخاصة .

٢ - القطاعات Sectioning

تستخدم القطاعات فى حالة الأعضاء النباتية والحيوانية التى تتكون من أكثر من نسيج وللحصول على قطاعات موحدة السمك قياسية وذلك بوضع النسيج أو البلوكات من الأعضاء فى مادة يمكن بواسطتها المحافظة على شكل النسيج والقطاع لتكون خلاياه أقرب مايكون الى الشكل الطبيعى بتدعيم هذه الخلايا باستخدام البارافين ، التجميد ، السليلوز حسب نوع النسيج أو العضو المراد عمل القطاع بـــه .

أ - طريقة التجميـــد : Freezing

تستخدم هذه الطريقة عند ادخال عامل الزمن كعامل موثر فى البحث أو الدراسة التى تجرى على المادة المعاملة أو فى حالة المواد التى لاتتحمل الطرق الأخرى مثل الأنسجة الدهنية التى تتلف باستخدام طريقة شمع البرافين أو السليلوز .

ب - طريقة السليلوز فى اعداد القطاعات : Celloidin

تعمل هذه الطريقة على زيادة التدعيم للنسيج عند اجراء التقطيع بالميكروتوم وفى حالة اعداد قطاعات بكميات كبيرة وذات سمك كبير لأنسجتها أو أكثر صلابـــة ، والأنواع التى لاتتحمل الحرارة العالية (٥٨ °م درجة انصهار الشمع) وهى ضرورية لتسييح الشمع فى طريقة البرافين . وفى طريقة السليلوز هذه ، لابد من اجراء التجفيف بواسطة الكحول المتدرج التركيز باستخدام الاثير الكحولى الذى يعتبر مذيبا للسليلوز ويستخدم لهذا الغرض ٣ محاليل من المذيب تمرر فيها العينات لمدة يوم الى عدة أسبيع ليتخلل السليلوز العينات وأنسجتها . ويبخر المذيب من العينات فتصبح أكثر صلابة ولذلك يلزم استبداله بالكلوروفورم ويتم ذلك على درجة حرارة المعمل (Room Temperature) تقطع القطاعات وتلصق بالشرائح ويزال السليلوز ، أو يترك فى حالة العينات التى تحمل باستخدام طريقة التحميل بالسليلوز . وعند ازالته يلزم أن يتم ذلك قبل اجراء خطوة الترويق باستخدام ابنزين أو الزيلين (للترويق) . ثم يجرى الصبغ والتحميل .

جـ — طريقة البرانين :

ان هذه الطريقة تعتبر أكثر طرق الميكروتكنيك انتشارا وتستخدم لعمل القطاعات فى جميع الانسجة النباتية والحيوانية ، وسهلة التنفيذ اذا ماقورنت بطريقة السليولوز ، وتمر البلوكات بعدة خطوات قبل الطمر فى الشمع ونظرا لأن الشمع لايذوب فى الماء فانه يلزم اجراء التجنيف قبل اجراء الطمر فى البرانين ، ويستخدم الكحول المتدرج التركيز قبل الطمر ويزال من البلوكات بواسطة التلوين ، الكلوفورم أوبعض المذيبات الاخرى ، وبعد اختراق البارانين للانسجة وتخللها يجرى تبريد البلوكات لزيادة تدعيم القطاعات وهذا يساعد على احلال وتخلله فى فراغات الخلية لتسهيل التقطيع ، يثبت البلوكات فى الميكروتوم (حامل البلوك) ثم يجرى التقطيع الى شرائح دقيقة على الشرائح الزجاجية وتفرد بالماء الدافىء ، ويزال البارانين بواسطة المذيبات ثم تجفف بواسطة الكحول المتدرج التركيز فى أحواض خاصة ثم يتم الصبغ وتروق ثم تحمل باستخدام كندا بلسم ثم التغطية بغطاء الزجاج (الكفر) . وسنتناول فيما يلى خطوات تحضير القطاعات بطريقة استخدام الطمر فى شمع البرانين لأهميتها التى يدور حولها محور الدراسة فى الميكروتكنيك النباتى والحيوانى :

خطوات عمل القطاعات :

أ = القتل أو التثبيت أو التقوية

ب = التجنيف أو ازالة الماء الزائد

جـ = الترويق

د = الغمر فى شمع البرانين

هـ = التقطيع بالميكروتوم الى قطاعات على الشرائح الزجاجية .

و = الصبغ بالصبغات الملونة المختلفة .

ز = التحميل للحفظ المستديم .

وسنتناول هذه الخطوات مختصرة وتفصل كل فى موقعه كمواضيع مستقلة :

تجهيز معمل الميكروتكنيك

مكان المعمل : يمكن انشاء المعمل فى أى مكان مناسب بشرط أن يكون فى مكان بعيد عن مصادر التلوث والأتربة ،يتوفر به مصدر للكهرباء والمياه، ومناضد (بنشات) ثابتة لتوضع عليه الأدوات والأجهزة اللازمة للمعمل ومجموعة من الدواليب اللازمة لحفظ الكيماويات والخامات ،والشرائح وغيرها .

الأجهزة والأدوات اللازمة للمعمل : نورد هنا الأجهزة الأساسية والكيماويات بذكر الاسم فقط وكل جهاز أو مادة سوف يذكر استعمالهم بالتفصيل فى موقعه من عمليات التحضير المختلفة الواردة تباعا . وفيما يلى بيان للتجهيزات :

أ)ـ أجهزة معمل الميكروتكنيك :

١ـ ميكروتوم يدوى عادى ٢ـ ميكروتوم أوتوماتيكى (برافين)
٣ـ ميكروتوم ثلجى .

ب)ـ أجهزة الفحص والتصوير العلمى :

١ـ ميكروسكوبات ضوئية عادية ٢ـ ميكروسكوب تشريح (بيونكلر) .
٣ـ ميكروسكوب مركب للتصوير . ٤ـ ميكروسكوب الكترونى فى حالة المعامل المركزية الكبيرة .
٥ـ مجموعة عدسات للفحص العادى
٦ـ كاميرا تصوير علمى وعمل الشرائح العلمية .
٧ـ شرائح زجاجية وأغطية للشرائح وعلب ودواليب لحفظ الشرائح .
٨ـ معمل تصوير مصغر لتحميض وطبع الصور العلمية داخل المعمل .
٩ـ بروجكتور عرض الشرائح العلمية (فانوس سحرى) .

ج)ـ الكيماويات والمواد المساعدة الأخرى :

أ ـ المثبتات : مثل ١ـ حمض الخليك ٢ـ الفورمالين ٣ـ كحول
٤ـ حمض البكريك ٥ـ كلوريد الزئبقيك ٦ـ بيكرومات البوتاسيوم
٧ـ حمض الكروميك ٨ـ حمض الأوزميك ٩ـ جليسرين ١٠ـ فينول

ب ـ الصبغات : مثل الأيوسين والهيماتوكسلين والصفرانين والفوكسين الأستوكارمين ، الأزوكامين ، أزرق الانيلين وغيرها من الصبغات البيولوجية .

جـ ـ البرافين (شمع البرافين الخاص بالمعامل البيولوجية) ، والجلاتين . الزيلين ، والبنزين وغيره من المذيبات . مواد التحميل (كندا بلسم) .

د)ـ أدوات لازمة فى عملية اعداد الشرائح : ١ـ فرن الشمع ٢ـ مجفف
٣ـ أسطح تسخين (هوت بلات) ٤ـ برطمانات ٥ـ أحواض الصبغ .
٦ الشرائح والأغطية وعلب حفظها .

تنظيم العمل وإعداد المعمل

قبل البدء في عملية الميكروتكنيك لأى عينة لابد أن يوضع في الاعتبار تسجيل الخطوات التى ستجرى بتواريخها لكل عملية ، مع ضرورة وضع خطة أو برنامج ، ونرد بعض الأمثلة التى تفيد في عملية التسجيل وتنظيم العمل بالمعمل :

١ـ يكتب الاسم العلمى للكائن المراد عمل شرائح علمية له (قطاعات) .
٢ـ يحدد نوع النسيج نباتى كان أو حيوانى .
٣ـ يذكر المثبت وتاريخ القتل والتثبيت .
٤ـ يذكر طريقة التحضير المستخدمة أو الميكروتكنيك المستخدم في اعدادها مثلا (طريقة السحبة Smears ، أو السحق Teasing أو القطاعات في البرافين : Paraffin) .
٥ـ الصبغ Stain ونوع الصبغات المستخدمة .
٦ـ تاريخ اعداد عملية التجهيز وتاريخ انتهاء الشرائح العلمية للتصوير .

هذه البيانات مهمة مع ضرورة توضيح التائم بعملية الاعداد والتحضير تبين وتوضح هذه المعلومات على كارت على الشريحة النهائية

وهذا يؤدى الى تنظيم العمل داخل المعمل حتى في حالة الشرائح الكثيرة العدد . وتفيد هذه البيانات في حالة فقد عدد من الشرائح أوكسرها . ويجب أن ترتب المجاميع ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ..... الخ ويجب أن تضاف الأحرف الأولى لفنى المعمل لرقم الشريحة وهكذا :

وفى حالة اذا كان هناك أكثر من باحث يستخدم نفس الامكانيات المتاحة بمعمل الميكروتكنيك ، واذا أعدت أكثر من شريحة من قطاع واحد من نسيج معين فيمكن اعطاء الحروف والرموز التالية للشريحة :

وفى حالة اضافة معلومة جديدة تفيد فنى المعمل في تحسين العمل لنحصل في النهاية على شريحة مجهزة بطريقة جيدة يجب تسجيلها والعمل على الاستفادة منها ، وتسجل البيانات وتحفظ داخل كتالوج خاص بالمعمل تسجل فيه كل المعلومات أو يستخدم Loose - leaf ومثال لطريقة التسجيل في هذا الكتالوج كالتالى :

نموزج لصفحة الكتالوج بمعمل الميكروتكنيك

No.: .. تحضير رقم

المعهد الفنى الكيماوى
معمل الميكروتكنيك

Name of Technician: اسم الفنى :

Scientific name:
الاسم العلمى للكائن (العينة) :

Tissue:
اسم النسيج المحضر :

Fixative:
المثبت المستخدم :

Fixation Date:
تاريخ التثبيت :

Preparation Methods:
طريقة التحضير المستخدمة :

Sectioning Date:
التقطيع وتاريخه :

Staining:
الصبغ وأنواع الصبغات :

Slide finishing:
التحميل النهائى للشرائح والملاحظات :

No: of slides:
أرقام الشرائح :

Slide stores:
مكان حفظ الشرائح :

Note:
ملاحظات :

LABORATORY CATALOGUE دليل المعمل :

من صفحات الكتالوج السابق يمكن اعداد دليل المعمل ويستخدم الترتيم فى كل مرحلة من مراحل التحضير والعمل داخل المعمل خاصة اذا كان هذا العمل يجرى لأول مرة بالمعمل، حتى يمكن تتبع الخطوات المختلفة داخل المعمل والاستفادة بخبرة التحضيرات السابقة . ويجب أن ترتب الكيماويات لتكون سهلة التداول وعليها البيانات الكافية والتحذير من الأنواع السامة حتى يؤخذ الحذر عند تداولها ، كما تسجل الكميات التى تستخدم فى كل عملية تحضير . وترقم كل المراحل التى تمر بها العينة حتى تمام التحضير ففى حالة البرطمانات المحتوية على العينات تكتب الأرقام بمادة لا تتأثر بالمذيبات وفى حالة بلوكات الشمع تكتب الأرقام على القارب الورقى ، ويكتب الرقم على قاعدة البلوك عند اجراء عملية التقطيع .

تنظيف وترقيم الشرائح النهائية :

يجهز البادج أو الكارت للشرائح بعد تمام تنظيفها واعدادها ويعمل على حماية الشريحة من التلف بتكسرها أو تلوثها بالاتربة أو البراغين بعد وضع الغطاء عليها ، ويجب ترك الشريحة حتى تجف ثم تنظف ويستخدم سكين لتنظيف كندا بلسم (البلسم Balsam) الزائد دون اتلاف الغطاء أو سحب أى جزء منه من تحت الغطاء ، ومتبقيات البلسم تزال بواسطة سكين أو مشرط ثم تنظف بواسطة قطعة قماش مبللة بالزيلول ، وبعد تمام الجفاف يمكن غمس الشريحة فى الزيلول ثم فى الكحول حتى يتم نظافتها تملاء البيانات على التيكت قبل لصقه على الشريحة ويستخدم لذلك حبر أسود (حبر هندى Indian Ink) وتكتب البيانات باختصار شديد كما يلى :

No: Sci.N. Bouin's Alum-Hem.

ويمكن كتابة الرقم والمز على الجانب الأيسر الذى يترك فارغا بدون تكت باستعمال قلم (ماسة تقطيع الزجاج له سن مدبب لهذا الغرض) .

الشرائح النهائية تحفظ بعيدا عن الاتربة والتلوث وعن ضوء الشمس وتحفظ فى علب خاصة مرقمة وعليها بيان بمحتوياتها ، توضع فى دواليب مرقمة عليا صفحة من كتالوج المعمل السابق بيانه .

المثبتات والكيماويات المستخدمة ـ ٦٧ ـ

FIXATIVES

ان دراسة التركيب الدقيق للخلية (الميكروتكنيك) يتعدى عملية فحص الأنسجة الحية الى اجراء بعض العمليات على الأنسجة للمحافظة بقدر الامكان عليها لتكون أقرب الى التركيب الحي بقدر الامكان عند اجراء الفحص الميكروسكوبى ، وعملية القتل والتثبيت باستخدام المثبتات الكيميائية تحتفظ التركيب الخلوى لنسيج قريبا من الوضع الحى (Lifelike) ولذلك فان المثبت الجيد هو الذى يوقف أى تدهور يحدث للخليـــة . والمثبت المثالى يجب أن يتوفر فيـه الشروط الآتيـة :

١ــ له القدرة على اختراق الأنسجة بسرعة كبيرة .

٢ــ قتل الخلية بسرعة كبيرة وحمايتها ومنعها من التلف .

٣ــ يحافظ على التركيب الطبيعى للخلية والنسيج .

٤ــ يحول مركبات الخلية الى مركبات ثابتة لاتتأثر بعمليات وخطوات اعداد البلوكات والشرائح بعد التثبيت .

٥ــ يثبت مكونات الخلية على الوضع الذى كانت موجود عليـه أثناء القتل والتثبيت ويمنع انقسام الخلايا .

٦ــ يساعد على توضيح الاختلافات التى توجد بين الخلايـا وبين الأنسجة وبعضها .

٧ــ يساعد ويجهز الخليـة لتقبل الصبغات المختلفة بعد ذلك .

مما سبق يتضح أنه لايوجد مثبت مثالى فبعضها يعمل علـى ترسيب البروتين ، والبعض الآخر يذيب الكربوهيدرات أو الدهون الموجودة بالخلية أو يعمل على تجميع مكونات السيتوبلازم الخلـوى لذلك يجب اختيار أفضل المثبتات لكل نوع من الأنسجة سواء كان نبات أو حيوان ولذلك يلزم دراسة كل أنواع المثبتات لمعـرفة تأثيراتها المختلفـة على الخلايا والأنسجة وتسجيل كل ملاحظاتك أثناء استخدامها لأن الخبرة والمران الشخصى أحد عوامل النجاح الرئيسية فى اعداد الشرائح العلميـة .

وأشهر المثبتات المستخدمة في الميكروتكنيك هي :

١ــ حمض الخليك Acetic acid

٢ــ الفورمالين (٤٠٪ فورمالدهيد) Formalin

٣ــ كحول الايثايل والميثايل Alcohol

٤ــ حمض البكريك Picric acid

٥ــ كلوريد الزئبقيك Mercuric Chloride

٦ــ بيكرومات البوتاسيوم Potassium bichromate

٧ــ حمض الكروميك Chromic acid

٨ــ حمض الاوزميك Osmic acid

وهذه المود الكيميائية لاتستخدم مفردة في عملية التثبيت الا في حالات نادرة ولكنها تستخدم في صورة مخاليط من عدة مواد للحصول على أحسن النتائج للمثبتات كما سيوضح فيما بعد : وعلى سبيل المثال فان أحسن مثبت للسيتوبلازم (حمض الكروميك + بيكرومات البوتاسيوم) كما أن المثبت يساعد على حماية المواد داخل الخلية ومنع تجمعها (حمض الخليك + بيكربونات البوتاسيوم) . كما أن المثبت المركب التالي يمنع فقد مكونات الخلية ويساعد على انكماشها وتثبيت مكوناتها (كحول + حمض الكروميك + كلوريد الزئبقيك) . والمثبات السابقة هي قليل من كثير ويجب اختيار كل نوع مناسب لنوع النسيج المستخدم والعضو المستخدم في اعداد القطاعات ويلزم خلط المثبتات قبل استخدامها . وتعد المحاليل أو تخفف بالماء المقطر ويفضل اعداد المثبت قبل عملية التثبيت بوقت كاف حتى تتجانس مكوناته قبل استخدامه . ويضاف بكمية تسمح بغمر العينات وتغطيتها طوال مدة التثبيت .

استعرض أنواع المثبتات : Types of Fixatives

١ــ حمض الخليك Acetic acid

وهذا متخصص لتثبيت الأنوية ويرسب البروتينات وله قدرة كبيرة على اختراق الأنسجة والخلايا بسرعة كبيرة . وقد يؤدي هذا الى حدوث تلف لبعض مركبات السيتوبلازم مثل الميتاكوندريا ، وجسام جولجي والدهون والمواد الدهنية بصفة عامة . ويستخدم بكثرة في المثبتات المركبة مثل :

كما يستخدم مع المثبتات ضعيفة قدرة الاختراق والتى ليس لها القدرة على تثبيت النواة ومكوناتها ، أو فى حالة المثبتات التى تعمل على انكماش زائد للأنسجة ، ويمتاز بأنه لا يحتاج الى معاملة سابقة لعملية التثبيت لازالة الحامض الموجود فى النسيج من عملية الحفظ ، وكذلك فى حالة استعمال كيماويات تالية لعملية التثبيت وهذا لا يحتاج الى ازالة بقايا الحامض من النسيج . وسوف نوضح استخدامات حمض الخليك كمثبت فى بعض المثبتات .

٢ـ الفورمالين FORMALIN

الفورمالين أحد المثبتات قليلة الاستعمال لهذا الغرض، ولكنه كثير الاستعمال فى حالة حفظ العينات كما أنه يعمل على جودة صبغ العينات ، كما يوصى باستخدامه فى حالة تثبيت الأنسجة العصبية ويمكن استخدامه كمثبت سيتوبلازمى جيد ، سريع لاختراقه الأنسجة ويساعد على جفاف الأنسجة بدون تلفها وهذه الخاصية غير مستحبة فى حالة استخدام البرافين فى عمل القطاعات . ولا يوصى باستخدامه منفردا فى عملية التثبيت بل يفضل استخدامه مع المثبتات الأخرى لكى نحصل على أفضل النتائج .

والفورمالين عبارة عن محلول لغاز الفورمالدهيد يحتوى على ٣٨ـ ٤٠ % من غاز الفورمالدهيد ، وعند استخدامه يحضر كالآتى :

فورمالين (٤٠ % فورمالدهيد) ١٠ سم٣

ماء مقطر ٩٠ سم٣

وذلك للحصول على ١٠ % فورمالين (٤ % فورمالدهيد) وعند استخدامه كمثبت فى حالة الفقاريات يلزم استخدام المحلول الفسيولوجى المنظم (٠,٩ ٪ كلوريد صوديوم) ويمكن استخدام ماء البحر لنفس الغرض .

والفورمالين عادة يحتوى على حمض الفورميك ولذلك يلزم معادلة تلك الحموضة بإضافة كربونات الكالسيوم فى التحضيرات المجهزه منه وترشح

بعد اضافة كربونات الكالسيوم • والتثبيت بالفورمالين يستمر لمدة ٢٤ ـ ٤٨ ساعة توضع فيه العينات خلال هذه المدة ويمكن تركها لمدة أطول حسب نوع النسيج •

وبعد تمام التثبيت يلزم التخلص من بقايا الفورمالين بغسل فى الماء وبالنسبة للكائنات والأعضاء الصغيرة الحجم يمكن غسلها فى الماء عدة مرات كل مرة ١٥ ـ ٣٠ دقيقة تترك فى الماء خلال هذه المدة ، بلوكات الانسجة تترك فى الماء الجارى لمدة ١٢ ساعة (طوال الليل) Overnight

واذا كانت العينات ستحفظ فى كحول يلزم امرارها فى كحول ٣٠% ثم ٥٠ % لمدة ٣٠ دقيقة كل مرة وتحفظ فى كحول ٧٠ ـ ٨٠ % بدون غسيل فى الماء لان الغسيل بالكحول يزيل الفورمالين •

٣ ـ الكحول ALCOHOL

يمكن استخدام الكحول كمثبت بسيط وخاصة فى تجارب التشريح وفى أبحاث الأنسجة (نباتية أو حيوانية ( ) ، ويستخدم أيضا عند الخوف من وجود مواد تذوب فى الماء داخل النسيج مثل الجليكوجين • كما يستخدم فى حالة التثبيت للدم وغيره من تحضيرات (السحبات) مثل تحضير الدم بطريقة السحبة Smears وذلك لأن الكحول يؤدى الى جفاف الأنسجة وانكماشها • وكحول الايثايل ٩٥% الى ١٠٠ % يستخدم كمثبت للانسجة ، وكحول الميثايل يفضل كمثبت فى حالة التحضيرات بطريقة السحبات وأيضا يمكن استخدامه فى حالة الأنسجة ، والكحول الدافىء يستخدم ٧٠ % يستخدم كمثبت للنيماتو واليرقات الحشرية وخاصة الصغيرة وتحمل بدون صبغ أو تصبغ بالجلسرين جلى (Glycerine - Jelly) ، والكحول ٣٠ % يستخدم لتجهيز العينات قبل التثبيت ، ويفضل التثبيت بالكحول مع حامض الخليك الثلجى ليزيد من عملية اختراق المثبت للأنسجة ويزيد بالتالى من فاعلية المثبت •

ويدخل الكحول مع غيره من المثبتات لزيادة فاعليته ولحسن التثبيت نذكرها فيما يلى :

أهم المثبتات التى يدخل الكحول فى تركيبها :

أ ـ محلول كارنيوى. Carnoy's Fixat

Acetic alcohol (الخليك والكحول)

	رقم ١	رقم ٢
١ ـ كحول مطلق	٦٠	٦٠ سم ٣
٢ ـ حمض خليك ثلجى	٢٠	١٠ سم ٣
٣ ـ كلوروفورم	ـ	٣٠ سم ٣

والتركيبة رقم ١ أكثر استخداما عن التركيبة رقم ٢ ويزيد الكلوروفورم من عملية اختراق الأنسجة . وتستخدم هذه المثبتات فى تثبيت القطاعات السميكة ، وكمحلول تتل بتثبيت فى منصليات الأرجل ، والنيماتودا وبخاصـــة فى حالة الاسكارس وبيض الاسكارس ، ويتم التثبيت بسـرعة اذ أن البلوكات الصغيرة يجب ازالة المثبت بعد ٣٠ دقيقة فقط ، أما البلوكات السميكة يزال المثبت بعد عدة ساعات حسب نوع النسيج والسمك .

ب ـ فورمالين ـ خليك ـ كحول (ف . أ . أ .)

Formalin-Acetic-Alcohol(F.A.A. or A.F.A.)

	لاندوسكى	موسمان	للنبات
١ ـ فورمالين . . .	١٠	١٠	٥ سم ٣
٢ ـ حمض خليك ثلجى	٢	١٠	٥ سم ٣
٣ ـ ٩٥ ٪ كحول (ايثايل)	٥٠	٣٠	٣٥ سم ٣
٤ ـ ماء مقطـر	٤٠	٥٠	٣٥ سم ٣

ومخلوط التثبيت (لاندوسكى) يعتبر أفضل المخاليط فى تثبيت الأجنة الصغيرة ، أما (موسمان) فيعتبر أفضل المثبتات للأجنة الكبيرة وبلوكات الأنسجة المأخوذة من القناة التناسلية ، وبصفة عامة فان محلول (ف . أ . أ) يعتبر مثبت مثالى وقياسى لتثبيت أجزاء النبات المختلفـة .

ويجب ترك المثبت مع العينات لعدة أيام حتى يؤدى عمله .

وبعد انتهاء التثبيت بهذا المثبت يجب امرار العينات المثبتة فى كحول ٧٠ ٪ لازالة الزيادة المتبقية داخل النسيج ثم التخزين فى كحول ٧٠ ـ ٨٠ ٪ لحين اجراء عمليات الميكروتكنيك الأخرى .

٤ ـ حمض البكريك
Picric Acid

ان مخلوط حمض البكريك مع حمض الخليك الثلجي والفورمالين تعطى نتائج ممتازة فى عملية التثبيت وخاصة للنواه تفوق قدرته على تثبيت مكونات السيتوبلازم ، ويعتبر أشهر المثبتات فى تحضيرات الميكروتكنيك تحت اسم (بوان Bouin's Fluid) ان يستخدم لمختلف الانسجة والاعضاء والكائنات نباتية أو حيوانية وخاصة الانسجة الحيوانية .

محلول بوان : BOUIN'S FLUID

١ ـ حمض البكريك (محلول مشبع)	٧٥ سم ٣
٢ ـ فورمالين	٢٥سم ٣
٣ ـ حمض خليك ثلجي	٥ سم ٣

ويمكن تثبيت العينات لمدة غير محددة ولكن أفضل نتائج الصبغ نحصل عليها بعد تمام التثبيت ترفع العينات من المثبت مباشرة . وعادة يتم التثبيت خلال ١٢ ساعة أو أكثر حسب نوع العينة والنسيج . يمكن استبدال حمض البكريك بكحول تركيزه ٧٠٪ ، وقد وجد أن تدفئة المحلول يسرع من عملية اختراق الانسجة والتثبيت .

محلول هولاند : Hollande's Fluid

يعتبر أحد مشتقات محلول (بوان) الذى يستخدم فى تثبيت البروتوزوا (بطريقة السحبة) والفطريات والطحالب ، وكذلك فى تثبيت العظم الصغير . ويتركب هذا المثبت من:

١ ـ ماء مقطر	١٠٠ سم ٣
٢ ـ خلات النحاسيك	٥ر٢ جم
٣ ـ حمض البكريك............	٤ر٠جم
٤ ـ فورمالين	١٠ سم ٣
٥ ـ حمض الخليك الثلجي	٥ر١ سم

مايجب اتباعه بعد التثبيت بالمحاليل المحتوية على حمض البكريك :

المواد المثبتة فى مثبتات تحتوى على حمض البكريك يلزم اجراء غسيل لها بواسطة كحول ٧٠ ٪ ، ولا يستخدم الماء مطلقا .

اذ أن الانسجة اذا غسلت بالماء أو بكحول ضعيف تصبح رخوة وتضيع معالمها ولاتصلح لعمل القطاعات ، اذ لابد من التخلص من المثبت قبل اجراء أى تعرض للماء ، أو الكحول الضعيف .
وبمجرد ازالة حمض البكريك من الأنسجة وزوال اللون الأصفر منها ، يمكن للعينات أن تمر فى الخطوات التالية دون أن يحدث لها أى ضرر . والعينات التى تعامل لتثبيتها بمحلول بوان تمرر فى كحول ٧٠ ٪ حتى لايزول اللون الأصفر الدال على وجود حمض البكريك . ثم تنقل الى محلول كحولى ٣٠٪ لمدة ٣٠ دقيقة ثم فى كحول ٥٠ لنفس المدة ثم تغسل بعد ذلك بكحول ٧٠٪ .
وعند اجراء الخطوات التالية بغمر العينات فى شمع البرافين فليس من الضرورة ازالة كل متبقيات حمض البكريك ، اذ أن الكمية المتبقية تزال عادة قبل اجراء الصبغ بالخطوات التى تتم بعد التقطيع الى قطاعات من ازالة البرافين بالمذيبات التى منها الكحول .
ونفس الشىء عند اجراء الغمر فى السليلوز لا داعى للتخلص من بقايا حمض البكريك اذ يزال قبل خطوة الصبغ كما سبق ، وفى حالة ضرورة التخلص من حمض البكريك ووجود صعوبة فى ذلك لا بد من تسخين الكحول الى ٤٠ م مع اضافة كربونات الليثيم الى الكحول ٧٠ ٪ لاسراع عملية الغسيل .

٥ — كلوريد الزئبقيك
Mercuric Chloride

يعمل كلوريد الزئبقيك على تجمع البروتين ، وله قدرة كبيرة على الاختراق ويعطى نتائج جيدة فى القطاعات الهستولوجية وقد يتسبب فى اتلاف أهداب الخلايا وبعض التفاصيل الدقيقة ، كما يؤدى الى انكماش محتويات السيتوبلازم ، ويستخدم المحلول المشبع فى عملية حفظ العينات ز ، أما فى عمليات التثبيت فيستخدم مخلوطا مع حمض الخليك الثلجى وغيره من المثبتات الأخرى .
وتختلف درجة الذوبان لكلوريد الزئبقيك باختلاف المذيبات

المستخدمة ولهذا فان درجة ذوبانه فى ١٠٠ سم ٣ تبلغ ٥ر٤ جم بينما فى ماء البحر تبلغ درجة الذوبان فى المحلول المشبع حوالى ١٥ جم/ ١٠٠ سم ٣ ماء مالح ، كما أن سرعة الذوبان تزيد بزيادة نسبة الملوحة ، والكحول.

ونظرا للسمية العالية لكلوريد الزئبقيك يلزم الحذر الشديد حتى لا يحدث تسمم أثناء أى مرحلة من مراحل اعداد المثبت ولذلك يجب مراعاة الحذر من استخدام مسحوق الكلوريد وكذلك عند اعداد المحاليل له.

وفيما يلى أهم محاليل التثبيت المحضرة من كلوريد الزئبقيك:

أ — كلوريد الزئبق + حمض الخليك

١ — محلول مشبع من كلوريد الزئبقيك .... ١٠٠ سم ٣
٢ — حمض خليك ثلجى .... ٥ سم ٣

يستخدم بصفة خاصة فى تثبيت الديدان المفلطحة مثل الدودة الكبدية والاسكارس والبهارسيا ، وأنسجة النبات ، وأنسجة الفقاريات مع ضرورة استخدام محلول ملحى فى عملية اعداد المحلول المشبع من كلوريد الزئبق.

ب — محلول زنكر Zenker's Fluid

يعتبر من أشهر مركبات كلوريد الزئبق المستخدمة فى عملية التثبيت وخاصة فى حالة الرغبة فى الحصول على نتائج أفضل لتثبيت السيتوبلازم والتركيبة يمكن تغييرها باضافة حمض الخليك الثلجى ، اذ أن التركيبة الرئيسية تحتوى على ١ جم سلفيت الصوديوم لكل ١٠٠ سم ٣ محلول والان أصبح التركيب المستخدم فى التثبيت:

	زنكر	هيللى
١ — محلول مشبع من كلوريد الزئبق	١٠٠	١٠٠ سم ٣
٢ — بيكرومات البوتاسيوم	٥ر٢	٥ر٢ جم
٣ — حمض الخليك الثلجى	٥ سم ٣	—
٤ — فورمالين	—	٥ — ١٠ سم

ويحتفظ محلول كلوريد الزئبقيك وبيكرومات البوتاسيوم ، ولا يضاف الفورمالين وحمض الخليك عند اجراء التثبيت وقبل الاستعمال مباشرة.

المثبت (هيللى) يستخدم فى حالة استخدام الصبغ بالانيلين.

ب — محلول سوزا Susa's Fluid

يعتبر هذا المثبت ثانى مثبت من كلوريد الزئبق كثير الاستعمال مستخدما مع ثلاثى كلوريد حمض الخليك مع الفورمالين :

١— محلول مشبع من كلوريد الزئبق .... ٨٠ سم ٣
٢— كلوريد الصوديوم .... ٥ر٠ جم
٣— ثلاثى كلوريد الخليك .... ٢ر٠ جم
٤— حمض الخليك الثلجى .... ٤ر٠ سم ٣
٥— فورمالين ٢٠سم ٣

ان استخدام هذا المثبت يشبه زنكلر ويستخدم خاصة فى حالة تثبيت الأنسجة الليفيةولهذا يستخدم ثلاثى كلوريد الخليك . والمواد المثبتة بهذا المثبت يلزم غسلها فى محلول كحلى ٧٠٪ وبوديد الكحول ثم تمرر فى كحول ٣٠٪ ، ٥٠٪ لمدة ٣٠ ، ٦٠ دقيقة .

جـ — محلول شودين Schaudinn's Fluid

يعتبر أهم مثبتات كلوريد الزئبقيك لتثبيت الكائنات وحيدة الخلية مثل البروتوزوا والفطريات والطحالب . ولا يوصى باستخدامه فى حالة تثبيت الأنسجة .

١— محلول مشبع من كلوريد الزئبق .... ٦٦ سم ٣
٢— كحول ٩٥٪ ٣٣سم ٣
٣— حمض الخليك الثلجى .... ٥ سم ٣

ان استخدام هذا المثبت فى تثبيت المسحبات من البروتوزوا يستمر لمدة ١٥ — ١٠ دقيقة .

معاملة العينات بعد التثبيت بمحاليل كلوريد الزئبق:

فيما عدا محلول سوزا ، تغسل العينات المثبتة فى ماء جار طوال الليل ثم يمرر العينات فى الكحول ٣٠٪ ، ٥٠ لمدد ٣٠ — ٦٠ دقيقة ، ثم تمرر فى كحول ٧٠٪ . وكل المثبتات المستخدمة من كلوريد الزئبقيك يستخدم معها الأيسودين فى كحول ٧٠٪ لتوضيح امكان معرفة التخلص من كلوريد الزئبقيك بزوال لون اليود من النسيج .

ويحضر محلول مشبع من الأيود ين :

١ــ محلول مشبع من الأيود ين فى كحول ٧٠ ٪ ٥ سم٣

٢ــ كحول ٧٠ ٪ ١٥ سم٣

وتحتاج البلوكات السميكة المثبتة بواسطة كلوريد الزئبقيك الى أسبوع أو أكثر لازالة متبقيات المثبت والى أن يزول لون اليود (بنى اللون) . وعند استمرار البلوك فى الاحتفاظ بلون اليود يجرى الغسيل فى كحول ٨٠ ٪ ويمكن حفظه فى هذا الكحول حتى تمام ازالة اللون .

فى حالة التحضيرات الكحولية للمثبت تمرر فى كحول ٧٠ ٪ ثم فى محلول كحولى للأيود ين . والبلوكات المعاملة بالأيود ين تحتاج الى الغسيل لمدة طويلة . أما البروتوزوا فتحتاج الى مايقرب من ٢٠ دقيقة .

واذا تركت بقايا من كلوريد الزئبقيك يؤدى هذا الى عدم جودة التلوين وخاصة للنواة ولذلك بعد التقطيع فى هذه الحالة تعامل القطاعات بواسطة اليوديد الكحولى .

٦ــ بيكرومات البوتاسيوم

Potassium Bichromate

تعتبر من أفضل مثبتات السيتوبلازم ، يعتبر سريع الاختراق للخلايا ويثبت محتوياتها بسرعة ولا تترك فيه الأنسجة مدة طويلة لسرعة تأثيره . ويعتبر أحد بعد اثل (محلول زنكر) ، وأهم مستحضرات بيكرومات البوتاسيوم هو (محلول سميث) .

SMITH'S FLUID محلول سميث

يعتبر محلول قتل وتثبيت ممتاز لمحتويات الصفار فى بويضات الحشرات وغيرها من اللافقاريات وكذلك من مثبتات النبات الهامة ، ويثبت جيدة اليرقات .

١ــ بوتاسيوم بيكرومات . . . . ٥ جم

٢ــ فورمالين ١٠ سم٣

٣ــ ماء مقطــر ٨٨ سم٣

٤ــ حمض خليك ثلجى . . . . ٢٫٥ جم

ويحضر محلول التثبيت مباشرة قبل استعماله حتى لا يحدث تغيره والتثبيت يتم لمدة ١٢ــ٢٤ ساعة ويستبدل الفورمالين بالكحول اذا استمرت عمليات التحضير لاتمام القطاعات .

ويزال بيكرومات البوتاسيوم من العينات بغسيل العينات بالماء الجاري لمدة ١٢ ساعة •

٢ — حمض الكروميك
CHROMIC ACID

يعتبر مثبت جيد للسيتوبلازم ومحتوياته وخاصة عند انقسام الخلايا وفى أبحاث الوراثة ودراسة التغيرات الكروموزومية ، الا أنه يعاب عليه أنه يؤدى الى انكماش الخلايا ، وأشهر تحضيراته " محلول فليمنج " الذى يتكون أساسا من حمض الاوزميك ويرتب تحته • وفيمايلى أهم المثبتات :

أ — محلول الكرومو— نيتريك
Chromo-Nitric

مخلوط من حمض الكروميك وحمض النيتريك والكحول ويوصى باستخدامه فى حالة تثبيت القطاعات التى تؤخذ من العين ، كما يوصى باستخدامه فى تثبيت الاجنة وكمثبت فى الدراسات الهستولوجية بصفة عامة ، كما يمكن استخدامه فى تثبيت الحيوانات البحرية ويوجد منه نوعان من المثبتات :

	بيرنى	ليس
١— حمض الكروميك ....÷	٣٠سم ٥% —	٣٠سم ١%
٢— كحول ....÷	٣٠سم ٩٥%	٣٠سم ١٠٠%
٣— حمض النيتريك	٤٠سم ١٠%	٣٠سم ٢٠%

ب — محلول كاربكينكو
Karpechenko's Fluid

يتركب من حمض الكروميك والفورمالين وحمض الخليك الثلجى ، ويعتبر أهم مثبت للنبات " اذ أنه أهم المثبتات استخداما فى الدراسات الهستولوجية النباتية وتوجد تركيبات عديدة وأهمها :

١— ١% محلول حمض الكروميك ٥٠سم ٣
٢— فورمالين ٤٠سم ٣
٣— حمض خليك ثلجى ٥سم ٣

هذا المثبت (النباتى : للأنسجة النباتية) يجب اعداده مباشرة قبل اجراء التثبيت وتوضع به الأنسجة النباتية لمدة ٢٤ ساعة •

ـ ايجب عمله بعد التثبيت : يلزم اجراء الغسيل بالماء لمدة ١٢ ـ ٢٤ ساعة . والمثبت الذى يتكون من كرومو ـ نترو ـ كحول ، يزال من العينات بالمعاملة بالكحول ٧٠٪ عدة مرات حتى يتم ازالة المثبت .

٨ ـ حمض الأوزميك
Osmic Acid

يحافظ على مكونات السيتوبلازم لتكون أقرب الى الشكل الطبيعى وهو ضعيف فى قدرته على الاختراق وقليل التأثير على النواة . هذا المثبت سام وخطير على الأنف والأعين . ولذلك لا يستخدم فى الدراسات الهستولوجية . ولهذا يوضع حمض الأوزميك فى كبسولة يجب الحرص الشديد عند فتحها . وأهم محلول تثبيت هو :

محلول فليمنج حمض الأوزميك
Flemming's Osmic Acid Fluid

	محلول ضعيف	قوى
١ ـ ١٪ حمض الكروميك	٢٥ سم	٣٠ سم
٢ ـ ٢٪ حمض الأوزميك	٥ سم	٨ سم
٣ ـ حمض الخليك	١٠ سم ١٪	٢ سم ثلجى
٤ ـ ماء مقطر	٦٠ سم	ـــــ

تغسل العينات بعد تثبيتها فى ماء جارى لمدة ١٢ ساعة أو أكثر . اذا وجدت العينات داكنة بعد الغسيل يستعمل (بيروكسيد الهيدروجين فى كحول ٧٠٪ قبل الصبغ ويزال بالماء لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة .

تثبيت العينات

FIXATIONS

المقصود بالتثبيت هو استخدام المثبتات الكيمائية السابقة في قتل وتثبيت الأنسجة والخلايا الحية سواء كانت نباتا أو حيوانا ، وذلك بغمر هذه الكائنات في تلك المثبتات بالنسبة للنبات بعد تقطيعها الى أجزاء تسمح باختراق المثبت بسرعة • أما بالنسبة للحيوانات بعد القتل مباشرة ، اذ أن الهدف هو الحصول على خلايا أقرب الى الوضع الحي في شكلها وتركيبها بعد التثبيت •

ويراعى أن يكون الأجزاء النباتية والبلوكات الحيوانية في حجم يسمح للمثبت باختراقها والوصول الى كل أجزاء الخلية بسرعة كبيرة ولهذا يضاف المثبت بكمية كبيرة على العينات تعادل ٣٠ ـ ٥٠ حجم قدر النسيج المراد تثبيته كما يلزم تقطيع العضو أو العينة الى شرائح وأجزاء صغيرة باستخدام مشرط ويجب القائها في المثبت مباشرة ولا تترك حتى تجف ويجب أن تختلط أى مواد على العينات قبل تثبيتها حتى لا تتغير صفاتها ويتم ذلك بأن يكون التقطيع والتشريح في وجود محلول ملحى فسيولوجى منظم سواء في حالة النبات أو الحيوان (في حالة النبات واللافقاريات يكون تركيز المحلول الملحى ٧٥ر٠٪ بينما في حالة الفقاريات والحيوانات ذات الدم الحار يكون تركيز المحلول الملحى ٩ر٠٪ كلوريد صوديوم) ، أو يستخدم محلول رنجر السابق الذكر •

وعند تجزيء العينات يفضل تغطيتها بجزأ من المثبت حتى لا تتعرض للجفاف ، وفي حالة استخدام المثبت من نوع كلوريد الزئبقيك يلزم اضافة محلول ملحى اليه للمساعدة على زيادة فعله وعدم تلف العينات • في حالة العينات التى كانت محفوظة في كحول يجب تركها مبللة به أثناء تجزئتها حتى لا تتعرض للجفاف قبل تثبيتها •

ويجب أن يكون تجزئة وتقطيع العينات في خطوط مستقيمة محورية بالنسبة لجسم الحيوان أو النبات ، ويتناسب تقسيم الأجزاء في خطوط تتناسب مع محاور الساق والجذر ، وكذلك مع المحور الطولى والعرضى للحيوان •

ففى النبات يستخدم المصطلح قطاع طولى
الذى يمر موازى للمحور الطولى لجزء النبات المعمول منه البلوك
عرضى عند ما يمر القطاع فى خط مواز للمحور العرضى .
وبالنسبة للحيوان فيستخدم المصطلح
عند ما يمر القطاع بالمنطقة العليا ، والمصطلح
عند ما يمر القطاع مواز للمحور الطولى للحيوان ، وعندما يمر
القطاع مواز للمحور العرضى يستخدم المصطلح
(شكل) .

وعموما يجب أن يتناسب القطاع مع شكل العضو فمثلا فى القناة الهضمية ينتشر استخدام القطاعات العرضية
وفى الجلد يستخدم أيضا القطاعات العرضية ، بينما فى الأنسجة العضلية يختلف شكل القطاع تبعا لمروره بمحور الخلايا العضلية .

تخدير الحيوانات وقتلها قبل التثبيت

ANETHETIZING AND KILLING

اللافقاريات والأطوار الغير كاملة للفقاريات يجرى تخديرها قبل التثبيت ويجرى القتل بواسطة المثبت بعد ذلك ، والمخدر يضاف الى الماء الموجود به الحيوانات أو يحقن فى حالة الحيوانات الكبيرة ، ويضاف المخدر تدريجيا وتتوقف كميته على حجم الحيوان ، وعلى نوع المخدر وتركيبه ، وبعد تخدير الحيوان فى الوسط المائى يضاف المثبت بعد ذلك الى الوسط الموجود به الحيوان ثم يزال المخلوط بعد ذلك ، ويضاف بدلا منه محلول القتل والتثبيت وفى حالة الحيوانات الكبيرة الحجم أو التى يراد أخذ عينات منها لعمل قطاعات هستولوجية بها تخدر بمخدر خاص بالحقن تبعا لوزن الجسم حتى اجراء الجراحة ثم تعود الى حالتها كما فى حيوانات التجارب (الفيران والأرانب) وغيرها .

مواد التخدير البسيطة للحيوانات اللافقارية أو التى يراد قتلها كلية :

ا ـ سلفات المغنسيوم : تسبب الشلل الكلى لكل من الحيوانات

البحرية وحيوانات المياه العذبة ، وتضاف أملاح سلفات المغنسيوم الى البيئة الموجودة بها الحيوانات الصغيرة ثم يسمح لها بالذوبان فى الماء ، أو يذوب تدريجيا فى محلول ملحى أو فى ماء البحر.

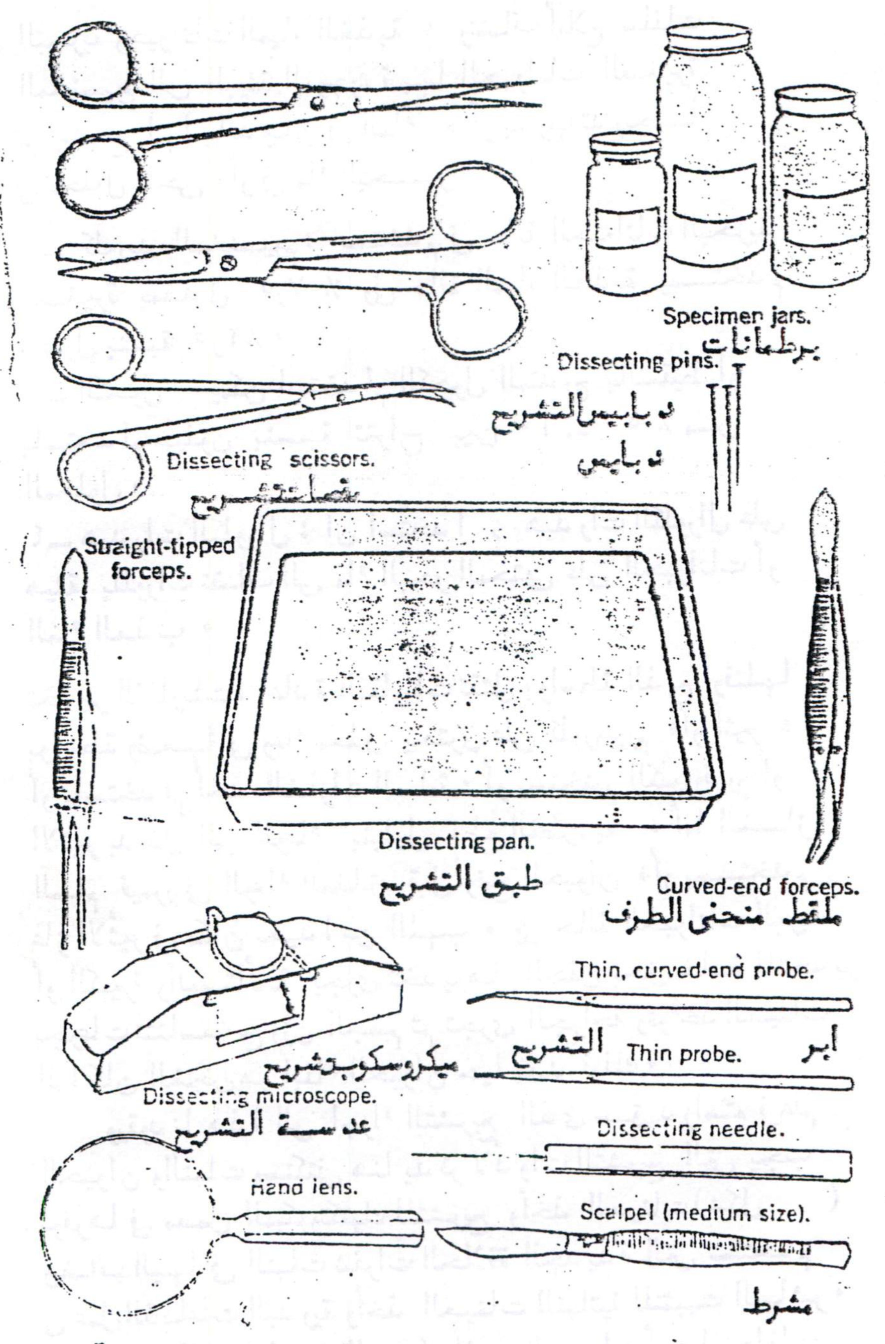
٢- كلوريد المغنسيوم : يستخدم فى حالة الحيوانات البحرية الصغيرة بمعدل ٧٫٥ ٪ وفى حالة المياه العذبة يستخدم محلول بنسبة ٢٫٥٪.

٣- الكحول : يمكن استخدام الكحول المتدرج بالتنقيط أو باستخدام سيفون بنسبة تتراوح بين ١٠ - ٥٠ ٪ من المحلول.

٤- هيدرات الكلورال : ان استخدام هيدرات الكلورال على هيئة بللورات تضاف الى ماء البحر المحتوى على الحيوانات أو الماء العذب.

تخدير الفقاريات: عادة الفقاريات تقتل بواسطة الذبح أوقتلها بواسطة وضعها فى وعاء مغلق يحتوى على كلوروفورم ، أو أثير ، أو باستخدام أحد الغازات السامة . أو يستخدم الكلوروفورم أو الاثير يدخل الى الوعاء بتبليل قطع القطن به ، أما الغاز السام فيمرر فى الوعاء المغلق قبل وضع الحيوان ، أو يستخدم غاز الأثير فى مكان بعيدا عن اللهب ، وفى حالة الحيوانات البرية أو الكبيرة والمستأنسة يجرى تخديرها بالحقن بحق خاصة للتخدير بجرعات تتناسب مع وزن الجسم ثم تجرى الجراحة وتؤخذ العينات اذا كان الغرض هو ابقاء الحيوان حيا بعد ذلك.

ويقودنا هذا الى اجراء التشريح الذى سبق دراسته فى علم الحيوان والنبات وسنكتفى هنا بذكر لادوات التشريح التى يجب توفرها فى معمل الميكروتكنيك للتشريح وأخذ العينات (شكل) ويضاف اليها فى النبات شفرات الحلاقة الجديدة التى تستخدم فى عمل القطاعات اليدوية وأخذ العينات النباتية للتثبيت المباشر. ومجموعة من الفرش (فرش الرسم) لفرد السحبات أو عمل حلقات حول الغطاء الزجاجى للشريحة (الكفر).



أدوات التشريح لاعداد عينات الميكروتكنيك

BASIC DISSECTION EQUIPMENT

تثبيت اللافقاريات
Fixation of Invertebrates

يجرى تثبيت البروتوزوا فى البيئة الموجودة بها بإضافة المثبت الى المزرعة The culture واذا كان عدد الحيوانات قليلا فى المزرعة فيعمل لها طرد مركزى وتعامل المتبقيات بالمثبت لزيادة تركيز الحيوانات وسهولة اجراء التحميل ، وبالنسبة للأميبا يسمح لها بالتكاثر وتوضع على الشريحة على شكل فيلم ثم يضاف المثبت الى السحبة بالتنقيط ، ويمكن عمل السحبة بابرة التشريح أو فرشة أو قطعة قطن مبللة من المزرعة (التبليل يكون بمحلول ملحى ٧ر٠ ٪) وبالنسبة للديدان الورقية (الدودة الكبدية ، البلهارسيا) وغيرها توضع بين شريحتين فى وسط محلول ملحى فسيولوجى ويضاف المثبت ويمكن تثبيت الشريحتان وبينهما الدودة وغمرها فى محلول التثبيت وفى حالة البروتوزوا لا يسمح بجفاف السحبة بل تحضر فى وجود المحلول الملحى حتى يتم اعداد السحبة ويوضع عليها المثبت ، ويمكن عمل حلقة من مادة لاصقة حول السحبة المحتوية على الحيوانات الأولية (البروتوزوا) بطريقة (" مويرز ") :

١ــ البيومين البيض ٥ سم٣
٢ــ جليســـرين ٥٠ سم٣
٣ــ سلسيلات الصوديوم .... ١ جم

ويستخدم الماء المقطر الساخن لاعداده وتخلط معه الحيوانات الأولية ويمكن اضافة صبغة مثل أزرق الميثلين وتفرد التحضيرة على الشريحة وتترك لتجف أو تبرد فى ثلاجــة .

ويمكن تحضير وتثبيت " مخلفات المعدة " والروث ، بنفس الطريقة لفحص البروتوزوا الطفيلية وطفليات الانسان ، وفى حالة فحص بيض هذه الطفيليات يعمل طرد مركزى للمخلفات سلفات الزنك وتحميل المتبقيات التى تحتوى على البيض ثم يعمل السحبة وتضاف محلول القتل والتثبيت ويمكن خلط الناتج من الطرد المركزى بتحضير مويرز السابق أو يستخدم محلول " ملاكاتر و ميورا " كمادة تحميل

١ــ ماء مقطر ٥٠٠ سم٣
٢ــ جلســرين ٥٠٠ سم٣
٣ــ أخضر الملاكيت ٣٪ فى محلول مائى ٣ سم٣

ويساعد الجليسرين على الترويق مع وجود الصبغة تسهل الفحص .

يمكن جمع اليرقات على سطح بند من بالمثبت بواسطة فرشاة ناعمة ثم تغمر بعد ذلك في محلول " بوان " ونفس الوضع يتبع مع الأجنة الصغيرة ، أما الأجنة الكبيرة فتقسم للوصول الى حجم البلوكات المناسب لطرق الشمع ، ويمكن أن يغمر في الجيلاتين قبل التثبيت للمحافظة على المكونات الداخلية للجنين ،

وفي حالة أجنة الثدييات تزال من الرحم ولا يفتح على السائل الأمنيوني الا قبل التثبيت بمباشرة والجنين الذي يزيد طوله عن ٥ سم يجب أن يقسم للمساعدة على اختراق المثبت للأنسجة ويستخدم محلول " بوان أو لافد وقسكي " في عملية التثبيت للأجنة الصغيرة الحجم أما الكبيرة الحجم فيستخدم " محلول موسمان "

تثبيت بلوكات الأنسجة الحيوانية المختلفة

Fixation of Tissue Blocks

يجب سرعة ازالة النسيج أو العضو بعد تخدير الحيوان مباشرة أو بعد قتله حسب الحالة ويوضع بأقصى سرعة في محلول القتل والتثبيت ويجب أن يكون البلوكات في قطاعات طولية أو عرضية حسب نظام التقطيع الى قطاعات لاظهار تفاصيل معينة (شكل) ويجب أن يكون القطاع المأخوذ من البلوك معبرا عن الغرض من التقطيع ، ونفس الشيء بالنسبة للنبات بعمل القطاعات في الأجزاء النباتية المراد فحصها ،

تجهيزات يلزم اجرائها أثناء تثبيت الأنسجة :

١ـ قبل التخدير والقتل للحيوان الذي ستؤخذ منه الأنسجة لعمل البلوكات يجب عمل الاتي :

أـ جهز المثبتات الضرورية والأوعية أو البطمانات التي ستوضع بها العينات .

بـ يجب أن يكون التقطيع أو التقسيم في وجود محلول ملحي فسيولوجي كما سبق التوضيح .

جـ تجهيز وعاء لاستقبال الدم الذي سينزف من النسيج والأعضاء .

د ـ تجهيز بيانات الكارت السابق الاشارة اليه لبيان الاسم ونوع الدراسة وكافة البيانات والبطاقة التي سترافق القطاعات أوخطوات العمل .

هـ ـ تجهيز كل الأدوات والمساعدين قبل اجراء العملية وكذلك تنظيم عمل كل واحد لأن للوقت أهمية كبيرة في معمل الميكروتكنيك .

٢ـ خدر أو اقتل الحيوان حسب الغرض من العملية .
٣ـ تخلص من أكبر كمية من دم الحيوان اذا كان القتل هو الوسيلة وافتح الأوعية الدموية فى الرقبة .
٤ـ بسرعة أزل الأنسجة التى سيجرى عليها التثبيت ، قسمها حسب البوكات التى ستغمر فى البرافين أو سيجرى عليها التقطيع . واغمرها مباشرة وبسرعة فى محلول القتل والتثبيت .

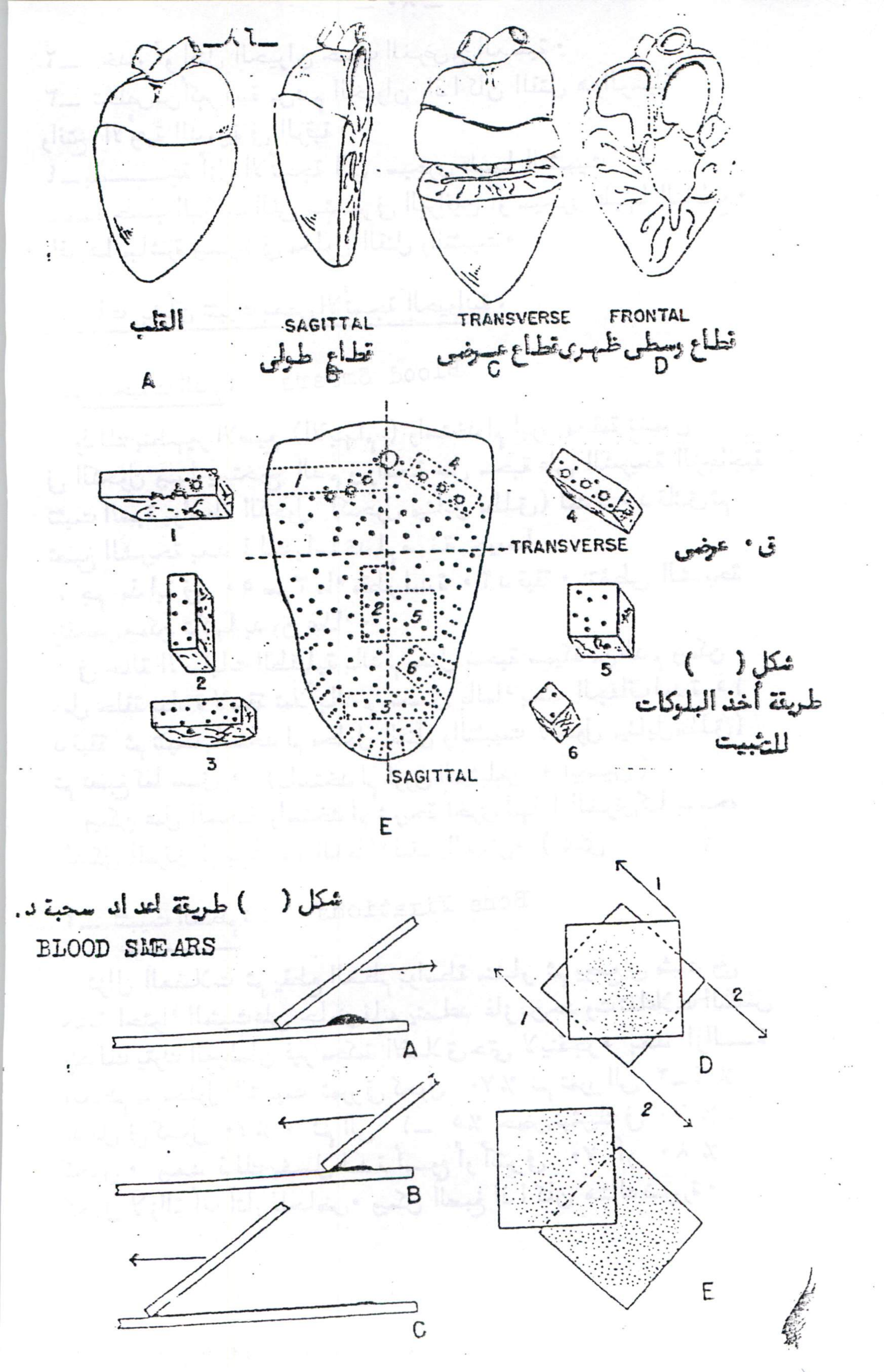
مقترحات بشأن تثبيت بعض الأنسجة الحيوانية :

١ـ سحبات الدم : Blood Smears

وذلك بتطهير الاصبع (الابهام) واستخدام ابره معقمة تغمس فى الكحول وبها يستخرج الدم وبواسطة عمل سحبة على الشريحة الزجاجية تثبت السبة بواسطة الكحول (كحول ميثايل مطلق) لمدة ٥ دقائق ثم تصبغ الشريحة بعد ذلك باستخدام صبغة جيمسا
١ جم مذابة فى ٥٠ سم٣ ماء مقطر لمدة ٣٠ دقيقة . تغطى الشريحة وتفحص ويمكن تركها بدون غطاء .
فى حالة الاصابات الطفيلية بالدم يعمل سحبة سميكة من الدم ويمكن عمل حلقة بمادة لاصقة تملأ بالدم تغسل بالماء بعد الجفاف لمدة ٥١ دقيقة ثم تثبت باستخدام محلول القتل والتثبيت (كحول ميثايل مطلق) ثم تصبغ كما سبق . (باستخدام أزرق الميثيلين + أيوسين)
ويمكن عمل السحبة واستخدام شريحة أخرى لهذا الغرض كما يوضحه الشكل المرفق أو يستخدم الغطاء لنفس الغرض . (شكل)

٢ـ تثبيت العظم : Bone Fixations

تزال العضلات ثم يقطع العظم بواسطة منشار ثم يوضع فى مثبت وفى حالة احتواء المثبت على حامض فانه يتصاعد غاز من حدوث تفاعلات التكلس ولذلك يترك البرطمان غير محكمة الاغلاق حتى لا ينفجر . بعد ازالة العظم من محلول التثبيت تمرر فى كحول ٧٠ % ثم تمرر الى ٢ـ٤ % يدكل فى كحول ٧٠ % ، ثم الى ١ـ ٥ % حمض نيتريك فى ٧٠ % كحول . وبعد ذلك يغسل لمدة أسبوع أو أكثر فى ٧٠ أو ٨٠ % كحول لازالة أى آثار للحامض . ويمكن الصبغ اذا كان هناك ضرورة .


القلب
A
SAGITTAL
قطاع طولى
B
TRANSVERSE
قطاع عرضى
C
FRONTAL
قطاع وسطى ظهرى
D
TRANSVERSE
SAGITTAL
E
ق · عرضى
شكل ( )
طريقة أخذ البلوكات للتثبيت
شكل ( ) طريقة لعداد سحبة د.
BLOOD SMEARS
A
B
C
D
E

٣- تثبيت القناة الهضمية : Digestive system Fixa

تجزأ القناة الهضمية الى قطع صغيرة تملأ بالمثبت حتى تتصلب ثم توضع فى المثبت لمدة ٣٠ دقيقة ويستمر وضعها فى المثبت حتى اجراء العمليات الأخرى اللازمة لعمل القطاعات ، ويملأ فراغ المعدة بواسطة الماصة واحترس من المواد السامة ولا تستخدم لهذا كلوريد الزئبق القاتل السام .

٤- تثبيت الأنسجة الدهنية : Fat tissue fixations.

تعد البلوكات التى سيستخدم فيها الميكروتوم الثلجى تثبت هذه البلوكات فى ١٠ ٪ فورمالين ، كما يستخدم الفورمالين فى تثبيت السارقا ويعتبر مثبت جيد للأنسجة الدهنية .

٥- تثبيت القلب : Heart Fixation

يقطع الى قطع صغيرة توضع فى محلول ملحى ثم يوضع فى المثبت بعد ذلك ويدفع المثبت بقدر الامكان فى الفراغات الموجودة بالبلوكات ، باستخدام محقن للمثبت يدفع بـه الى هذه الفراغات .

٦- تثبيت الرئـة : Lung Fixations

تثبت الرئة بدفع المثبت خلال التفرعات الشعبية باستخدام محقن أو باستخدام ماصـة مع الاحتراس الشديد حتى لا يحدث تسمم ويترك المثبت والعينات الموضوعة داخل وعاء التثبيت حتى اجراء العمليات التالية .

٧- تثبيت البنكرياس : Pancreas Fixations

يجب وضع البنكرياس مباشرة بعد استخراجه من الحيوان فى المثبت حتى لا تتلف خلاياه لأنها سريعة التحلل ، ويستعمل مثبت " هيلى "

٨- الغدة النخامية : Pituitary Fixation

يستخدم محلول التثبيت " هيلى " للمحافظة واتثبيت حبيبات السيتوبلازم .

٩- الجلد : Skin Fixations

يثبت الجلد بعد تجزأته وفصله من الحيوان ويخط عليه حتى يتشبع بالمثبت ويترك فى المثبت حتى اجراء العمليات التالية للتثبيت .

١٠- تثبيت الخصية : Testis Fixation

الخصية الصغيرة يجرى تثبيتها بوضعها فى المثبت مباشرة أما الخصية الكبيرة فيجرى تجزئتها بحذر شديد حتى لاتتلف الأنابيب المنوية بالخصية وتوضع فى المثبت. ويمكن حقن الخصية بالمثبت باستخدام محقن فى الأنابيب المنوية أو فى الأوعية الدموية مع وضع الخصية بعد ذلك فى نفس المثبت.

١١- تثبيت المثانة البولية : Urinary bladder Fix.

فى المثانة الصغيرة تملأ بالمثبت أما فى الكبيرة يجرى تجزئتها ووضعها فى المثبت.

١٢- تثبيت الرحم : Uterus Fixations

اذا كان حجمه صغيرا يثبت بوضعه مباشرة فى محلول التثبيت أما اذا كان كبيرا يجرى تقسيمه فى وجود المثبت ثم تغمر البلوكات بكمية كافية من المثبت.

التحضيرات الميكروسكوبية المؤقتة الغير صبغة

UNSTAINED PREPARATIONS

مواد عديدة حيوانية كانت أو نباتية تجهز ميكروتكنيكيا للفحص الميكروسكوبى على حالتها الطبيعية دون صبغ للفحص السريع دون الحاجة الى الاحتفاظ بها أو لدراسة الخواص الطبيعية دون استخدام ألوان أو يكون ليس ضرورة لتفاصيل أكثر تظهرها الصبغة وتستخدم هذه الطريقة فى الدراسات المورفولوجية والنسيجية كما فى حالة الشعر ، والريش ، وحراشيف الحشرات وحبوب اللقاح ، وفى قطاعات العظم والأسنان.

ويمكن الاشارة الى التحضيرات المؤقتة على الوجه التالى :

١- النقع: Maceration

تغمر قطعة النسيج فى المادة المراد فحصها فى محلول يؤدى الى اذابة مادة بين الخلايا اذابة جزئية وأهم المحاليل التى تؤدى الى هذا الغرض:

أ — كحول رانفير: Ranvier's alcohol

يمزج جزء من كحول قوى (٩٦٪) مع جزئين من الماء المقطر ثم توضع عينة صغيرة من النسيج الطازج فى المزيج وتترك وتترك فيه يوما واحدا أو أكثر.

ب — محلول مولر: Muller's Fluid

عبارة عن مزيج يتكون من بيكرومات البوتاسيوم ٢٥ جم وكبريتات الصوديوم ١٠ جم فى لتر من الماء المقطر.

ويلاحظ فى عملية النقع أن يكون النسيج المنقوع صغير الحجم بقدر الامكان وأن يؤخذ على شكل شرائح رقيقة وفى العادة تكون عملية النقع وسيلة لتسهيل عمليات أخرى كعملية التفريق أو التفتيت.

٢ — <u>التفريق أو التفتيت أو التفكيك:</u> Teasing.

فى النبات كان لهذه العمليات الفضل الكبير فى تقدم علوم الوراثة وتربية النبات وظهر حديثا " علم الهندسة الوراثية " اذ أن التفكيك لجزء النبات المراد اكثاره خضريا عن طريق الخلايا يتم تفكيك خلاياه بطرق معينة باستخدام " طاحونة " خاصة تشبه الخلاط المنزلى وباستخدام الميكروسكوب تختار الخلايا التى تربى على بيئة معينة لتتكاثر وتعطى النبات المطلوب الذى يكمل دورة حياته بعد ذلك فى الصوب الخاصة.

فى الحيوان المقصود بتلك العمليات هو تفريق الخلايا وابعادها وأيضا فى النبات لدراسة معينة ويستخدم لذلك ابر التشريح أو يجرى الهرس بين شريحتان أو بساف زجاجية للوصول الى الغرض من عملية فصل الخلايا.

٣ — <u>التحميل:</u> Mounting

يجرى التحميل بوضع التحضير المعامل على شريحة باستخدام أحد المحاليل التالية:

أ) — محلول الملح الفسيولوجى (٦ جم / لتر) للأوليات والنبات، (٩ جم / لتر) فى حالة الثدييات " ويستخدم كلوريد الصوديوم النقى.

ب) — الجلسرين: يستخدم للتحميل نقيا أو يضاف الى مثل حجمه ماء.

جـ) — حامض خليك ١٪: يضاف الى المحلول الملحى ليظهر الانوية.

التحميــــــل فى الجليســرين

GLYCERINE MOUNTS

يستخدم الجليسرين فى تحميل الكائنات الصغيرة الحجم فى تحميل النبات والفطريات فى التحضيرات السريعة وأيضا فى التحضيرات المستديمة ، كما أنه الوسيلة الجيدة المستخدمة فى تحميل حبوب اللقاح عند دراسة تقسيم النبات أو دراسات نحل العسل والملقحات الحشرية للنبات ، ويمكن استخدام الجليسرين + الماء بنسبة (١ : ١ أو استخدام الجليسرين النقى ، ويمكن استخدام " الجليسرين جيلى فى التحضيرات المستديمة مثل تحضيرات حبوب اللقاح .

وتحمل العينات فى الجليسرين بمجرد استخراجها من المثبت وخاصة اذا كان المثبت يحتوى على الماء والكحول عند التحميل فى الماء والجليسرين ، وفى حالة التحميل فى الجليسرين النقى يجرى الغسيل المتدرج فى الماء والكحول ثم فى خليط الماء والجليسرين ثم فى الجليسرين النقى ويبخر الماء أو الكحول من العينات بالتسخين الهادىء أو تترك العينات فى جو المعمل للتبخير بعيدا عن الأتربة وحتى التحميل فى الجليسرين النقى .

خطوات التحميل باستخدام الجليسرين كمادة تحميل :

١ ـ اجراء التثبيت فى الكحول باستخدام احدى المثبتات اللازمة ثم الغسيل والتمرير فى الكحول فى النهاية .

٢ ـ تمرر التحضيرات فى كحول تركيز ٧٠ ـ ٨٠ % ثم الى مخلوط من الجليسرين + ٨٠ % كحول بنسبة (١ : ٢ حجم) واترك الوعاء مفتوحا حتى يتبخر الكحول الى أن يصل الحجم الى النصف أو الثلثين قبل استخدام العينات ، ويجب حماية التحضيرات من الأتربة .

٣ ـ تجهز حلقة فى وسط الشريحة بالطريقة الموضحة بالشكل ( ) وتكون كافية حتى لا يلامس العينات غطاء الشريحة .

٤ ـ يوضع كمية من الجليسرين فى وسط الحلقة أو الخلية ثم ينقل التحضير الى الجليسرين ويغمس فيــه (نيماتودا ـ فطر ـ حبوب لقاح ـ تحضيرات حشرية ... وغيرها) . ويغطى بكمية كافية من الجليسرين تسمح بالتغطية بغطاء الشريحة .

٥ - يمكن عمل فيلم من العينات والجليسرين على الغطاء ويضع ويضع فوق الحلقة ، واذا لم تكن الكمية الكافية من الجليسرين المضاف تضاف كمية أخرى الى الحلقة (شكل)

٦- أزل الجليسرين الزائد باحتراس ثم ينظف مكانه بقطعة مبللة بالماء مع الاحتراس الشديد أثناء التنظيف .

٧- اصبغ الحلقة بمادة لاصقة " يمكن استخدام طلاء الأظافر " حول الحلقة لحفظ التحضير وحفظ الغطاء من التحرك .

التحميل في الجليسرين جيلي
GLYCERINE JELLY MOUNTS

الجليسرين جيلي يكون متصلب في درجة الحرارة العادية وتفيد هذه الخاصية في التحضيرات المستديمة للجليسرين . ويفضل اجراء القتل والتثبيت في الكحول ثم النقل الى الجليسرين قبل التحميل في الجليسرين جلي . وأهم تحضيرات الجليسرين جيلي هو :

كيزر جليسرين جيلي Kaiser's Glycerine Jel

ويتركب من الآتي : .....

١- جيلاتين : .... ١٠ جم
٢- ماء مقطر .... ٦٠ سم ٣
٣- جليسرين .... ٧٠ سم ٣
٤- فينول مركز .... ١ جم

يذاب الجيلاتين في الماء المقطر والتخين حتى الذوبان ، ثم يضاف الجليسرين والفينول (بللورات الفينول بمعدل ٢٥ر٠ جم لكل ١٠٠ سم جليسرين جيلي) أو يستخدم الفينول المركز بدلا من ذلك كما هو موضح بالتركيبة السابقة .

خطوات التحميل باستخدام الجليسرين جيلي :

١- تثبت العينات في الكحول أو استخدام أى مثبت آخر ثم اغسل في كحول ٧٠ - ٨٠ % .

٢ـ يحرر التحضير من الكحول الى الجليسرين + الكحول ٨٠ ٪ (بنسبة ١ـ٦ حجما) • واترك الوعاء مفتوحا بعيدا عن الأتربة ويترك حتى يصل المحلول الى نصف الحجم •

٣ـ عندما يكون الجليسرين جيلى متصلبا يوضع على حمام مائى حتى يسيل ويستخدم فى التحميل (درجة حرارة الحمام ٥٠ ْم) •

٤ـ توضع الشرائح على سطح ساخن
درجة حرارته بين ٤٠ ـ ٥٥ ْم •

٥ـ بعد اسالة الجليسرين جيلى فى الحمام المائى الساخن وذلك اذا ظهر كلاكيع على السطح تسكب ويترك الرائق •

٦ـ تستخدم ماصة موضوعة فى الماء الساخن فى نقل جليسرين جيلى التحميل ، ويوضع كمية مناسبة منه فى وسط الشريحة وهى موجودة على السطح الساخن •

٧ـ تنقل العينات النباتية أو الحيوانية المراد تحضيرها من محلول الجليسرين الى الجليسرين جيلى على الشريحة وترتب ويستخدم ابرة تشريح أو فرشاة ، أو ملقط مناسب • اذا كانت العينات سميكة تستخدم طريقة " الحلقة " كما هو موضح بالشكل •

٨ ـ يتم التغطية على العينات بغطاء الشريحة بحيث لا يترك هواء بين أجزاء العينة •

٩ـ توضع الشرائح المحملة فى مكان بارد حتى تجف وتجمد التحميل •

١٠ـ يزال الجليسرين الزائد بقطعة قماش مبللة بماء ساخن ويحاط الغطاء بمادة لاصقة مناسبة •

١١ـ تحفظ الشرائح فى مكان نظيف وعلب نظيفة •

استعمال الصمغ العربي في التحميل

ARABIC-GUM MOUNTS

يستخدم عندما يراد تحميل الحيوانات الصغيرة في عمليات الأرجل وبكميات كبيرة . وتستخدم هذه التحميلات في عمليات التقسيم في حالة التحميل في الصمغ العربي قد لا يحتاج الى عملية تثبيت او يستخدم التثبيت . واهم تحضيرات الصمغ العربي :

محلول برليزي

Berlese's Gum-Chloral Mountant

١- ماء مقطر .... ٤٠ سم ٣

٢- صمغ عربي .... ١٥ جم

٣- محلول جلوكوز .... ١٠ سم ٣

تخلط المركبات السابقة ثم يضاف اليها

هيدرات الكلورال المشبعة + حمض خليك ثلجي .. ٥سم ٣

<u>طريقة لعداد الشرائح باستخدام الصمغ العربي :</u>

١- توضع نقطة كافية في وسط الشريحة تتناسب وحجم العينة المراد تحميلها ، واذا كانت العينة كبيرة الحجم يستعمل نظام الحلقة .

٢- توضع العينة بعد قتلها مباشرة أو يجرى تثبيتها وتوضع في وسط نقطة التحميل .

٣- يغطى التحميل بغطاء الشريحة بحيث لا يترك فقاعات هوائية بين العينة والغطاء .

٤- تترك الشرائح المحملة لتجف لمدة أسبوع على الأقل ، ثم يثبت الغطاء بمادة لاصقة .

الصبغات - الصبغ

STAINS

تستخدم الصبغات فى الميكروتكنيك النباتى والحيوانى وتستخدم بطرق عديدة الهدف النهائى اظهار تفاصيل أكبر فى التركيب الخلوى الدقيق. ويرجع ذلك الى اختلاف المكونات الخلوية فى درجة اكتسابها للصبغات المختلفة التى تعامل بها القطاعات أو التحضيرات. كما تعمل على التفريق بين أنواع مختلفة من الأنسجة المصبوغة.

والصبغات التى ستذكر هنا هى الصبغات البيولوجية " أى التى تستخدم فى الدراسات البيولوجية " وتقسم الصبغات الى نوعان هما:

الصبغات النووية:

وهى الصبغات المتخصصة فى صبغ النواة فى الخلية ومكوناتها والشق الفعال فى أصباغ هذه المجموعة هو الشق القاعدى.

الصبغات السيتوبلازمية:

وتسمى بالأصباغ الحامضية التى تصبغ السيتوبلازم ومكوناته لأن الشق الفعال هو الشق الحامضى.

والأصباغ البيولوجية عبارة عن أملاح قاعدية أو حامضية.

وتقسم الصبغات البيولوجية الى قسمان كبيران هما:

أولا الصبغات الطبيعيـــة: The Natural Dyes

وهى تستخرج من مصادر طبيعية ولا يجرى تخليقها فى المعمل وتضم نوعان مهمان فى معامل الميكروتكنيك وهما ، الهيموتكسالين ، والكارمين وهما من الصبغات النوويـــة.

١- صبغة الكارمين: CARMINE

وتشمل التركيبتان:

1-Grenacher's Alum-Carmine
2- Grenacher's Alum-Borax Carmine.

٢- صبغة الهيماتوكسيلين: HEMATOXYLIN

ومنها ثلاث تركيبات:

1-Ehrlich's Acid Hematoxylin
2-Harris' Alum Hematoxylin
3-Heidenhain's Iron Hematoxylin.

أولا : الصبغات الطبيعية NATURAL DYES

١ـ الكارمين CARMINE

الكارمين مركب أحمر اللون يستخرج من حشرة قشرية تسمى Cochineal bug تعيش على بعض أنواع الصبار في المكسيك والمادة التجارية عبارة عن اتحاد حامض الكارمينيك مع الألومين ويستخدم الكارمين في الصبغ الكلي للعينات وفي صبغ القطاعات والكارمين متخصص في صبغ النواة ومكوناتها ويعطى السيتوبلازم ، وتعتبر صبغة الكارمين متخصصة في القطاعات والتحميلات النباتية وأهم تحضيرات تلك الصبغة :

أـ صبغة الكارمين وسلفات الالومنيوم

Grenacher's Alum Carmine

تتكون هذه الصبغة من:

١ـ ماء مقطر .... ١٠٠ سم ٣

٢ـ سلفات الالومنيوم النتراتية .... ٣ جم

٣ـ كارمين .... ١ جم

تخلط مكونات الصبغة السابقة وتغلى لمدة ١٥ دقيقة حتى يذوب الكارمين مع زيادة كمية الكارمين وسلفات الالومنيوم النتراتية (٢ جم كارمين + ٥ جم سلفات الومنيوم نتراتية) ، وللحصول على أحسن النتائج تخلط المكونات السابقة وتترك لعدة أيام ترج خلالها " باستخدام جهاز رج " ثم مع ١٠٠ سم كحول ٧٠٪ ثم يترك لعدة أيام مع الرج اليومى والترشيح بعد ذلك .

وتستخدم صبغة الكارمين بصفة رئيسية فى الدراسات الهستولوجية النباتية ، وتستخدم فى الصبغ الكامل للأجنة وللقطاعات الحيوانية .

ب ـ بوراكس ـ كارمن Grenacher's Borax Carmin

هذه الصبغة تتكون من : ١ـ ماء مقطر ١٠٠ سم ٣

٢ـ بوراكس ٤ جم ٣ـ كارمن ٢ جم

تخلط المكونات وتترك عدة أيام ترج يوميا خلالها ثم تخلط مع ١٠٠ سم ٣ كحول ٧٠٪ وترج جيدا وتخزن لعدة أيام مع الرج اليومى ثم تستعمل .

٢ـ الهيماتوكسيلين

HEMATCXYLIN

الهيماتوكسيلين مادة طبيعية تنتج من بعض أشجار الغابات فى أمريكا الجنوبية • لون المادة النقية أزرق غامق يتأكسد الى مادة هيماتين • ان تركيبة الصبغة من النوع " الوم ـ هيماتوكسلين " هى من أكثر التركيبات استخداما فى الدراسات الهستولوجية • وتعتبر الهيماتوكسليلين من الصبغات النووية الكروماتينية المهمة • ويستخدم مادة " سلفات الألومنيوم النتراتية " كمادة مثبتة للون •

وأهم تركيبات صبغة الهيماتوكسيلين :

أ ـ الهيماتوكسيلين الحامض :

Ehrlich's Acid Hematoxylin

تتركب هذه الصبغة من:

١ـ ماء مقطر ١٠٠ سم٣

٢ـ كحول مطلق (١٠٠ % كحول) ١٠٠ سم٣

٣ـ جليسرين ١٠٠ سم٣

٤ـ حامض خليك ثلجى ١٠ سم٣

٥ـ هيماتوكسيلين .... ٢ جم

(سلفات ألومنيوم نتراتية) .... ٢٠ جم

يذاب الهيماتوكسيلين فى الكحول ثم يضاف حامض خليك ثلجى ثم الماء ثم الجلسرين • يوضع المحلول فى ضوء الشمس لمدة شهران بعدها يصبح اللون أحمر غامق " وتضاف سلفات الالومنيوم النتراتية " قبل الانضاج فى ضوء الشمس أو بعده • وبعد تمام الانضاج تغلق البرطمانات جيدا وتحفظ فى دولاب مظلم بعدها يكون صالحا للصبغ • ويستخدم فى صباغة الحيوانات الكبيرة الكاملة أو فى الصبغ المتدرج للقطاعات المختلفة •

Harris' Alum Hematoxylin

ب ـ الوم ـ هيماتوكسيلين

تستخدم هذه الصبغة بكثرة فى الدراسات الهستولوجية فى حالة الصبغ المتدرج والصبغ الاسترجاعى • ويضاف الى الكمية المعدة ٢٠ % من سلفات الالومنيوم النتراتية كمثبت للصبغة •

وتتكون صبغة الالوم هيماتوكسيلين من :

١– هيماتوكسيلين .... ٥ر٠ جم
٢– سلفات الالومنيوم النتراتية .... ٠ر٢ جم
٣– ماء مقطر ١٠٠ سم٣
٤– أكسيد الزئبقيك .... ٥ر٠ جم

يخلط الهيماتوكسيلين مع سلفات الالومنيوم مع الماء ويغلى الخليط ثم يضاف أكسيد الزئبقيك وتعد الصبغة قبل الاستعمال بأسبوع على الاقل ، واذا وجدت رواسب ترشح قبل الاستعمال وتستخدم فى الصبغات المتدرجة وفى الصبغ الكامل وتستخدم فى حالة الصبغ الاسترجاعى Regressive وفى حالة الصبغ المتوالى (التدريجى)

ويتم الصبغ التدريجى بوضع العينات المراد صبغها فى محلول ٥ر٠ – ١ ٪ يدكل فى الماء المقطر ثم تغسل العينات حتى يتحول اللون الى اللون الازرق ويتم ذلك فى وسط قاعدى ويمكن لماء الصنبور أن يقوم بهذه المهمة ، وعند استخدام مادة سلفات الالومنيوم كمادة مثبتة للون يلزم غسل الشرائح الموجود عليها القطاعات أو الحيوانات المحاملة فى ماء جار لازالة كل أثر لتلك المادة .

ج – الهيماتوكسيلين الحديدى

Heidenhain's Iron Hematoxylin

تتكون هذه الصبغة من :

١– ١٠ ٪ هيماتوكسيلين فى كحول مطلق ٥ سم٣
٢– ماء مقطر ١٠٠ سم٣

وعند اعداد الهيماتوكسيلين بالاذابة فى الماء (٥ر٠ جم / ١٠٠ سم٣) وتخزن لمدة أسابيع حتى تصبح جاهزة للصبغ .

ومعظم استخدامات الهيماتوكسيلين تذاب فى كحول مطلق يحضر منه ١٠ ٪ هيماتوكسيلين للصبغ ويوضع الوعاء الزجاجى فى شباك معرض لأشعة الشمس لمدة ٦ – ٨ شهور مع عدم احكام الغطاء

على الأوعية المحتوية على الهيماتوكسيلين ، وبعد فترة الانضاج في ضوء الشمس يعاد للحالة المائلة باضافة الكحول ويحفظ في دولاب مظلم لحين الاستعمال .

في حالة استعمال صبغة الهيماتوكسيلين في الدراسات النباتية أو الحيوانية لدراسة أنسجتها تعامل تلك الانسجة بمادة مثبتة ٢ — ٤ % " سلفات الحديديك النشادرية (حديد — الوم) " قبل الصبغ ثم تمرر الأنسجة في صبغة الهيماتوكسيلين ، ويستخدم المثبت في حالة اعادة الصبغ ويجب أن يكون " سلفات الحديد الالومي " طازجا لايزيد مدة تحضيره عن أسبوع واحد ويجب أن يستبدل بعد كل برنامج صبغ . كما أن اعادة الصبغ يلزم غسل الانسجة في محلول ١% يدكل في الكحول أو في الماء ، أو تغسل في محلول مشبع من حمض البكريك في كحول ٩٥%.

ويستعمل الهيماتوكسيلين الحديدي مع صبغة الأخضر السريع أو البرتقالي ج ، أو مع الفوكسين الحامضي ، أو مع السفرانين O، والايوسين ، والاريثروسين ، وتصبغ الانسجة بلون أزرق بعد الصبغ بالهيماتوكسيلين ، واذا طالت مدة الصبغ تصبح لونها أقرب الى اللون الأسود .

ان الهيماتوكسيلين تستخدم كصبغة نووية كروماتينية ، كما تستخدم في صبغ العضلات ، والميتاكونديريا ، كمايستخدم في صبغ جدار الخلايا في النبات.

ثانيا : صبغات فحم القطران

THE COAL TAR DYES and STAINS

وهي صبغات صناعية تذوب في مذيبات مختلفة " الماء مع الكحول ، كحول الايثايل ، زيت القرنفل " . وتشمل عدة صبغات بيولوجية مهمة في الدراسات الميكروتكنيكية بعضها حامضي والاخر قاعدي وتعمل كصبغات نووية أو سيتوبلازمية ويعتمد ذلك على طريقة استخدام تلك الصبغات .

وأهم الصبغات التابعة لنحو القطران هى :

١ــ الفوكسين الحامض

ACID FUCHSIN

تستخدم بتركيز ٢ر٠ ــ ١ % فى كحول ٩٥ % وتستخدم بعد الصبغ بالهيماتوكسلين ، كما تستخدم فى الصبغ المركب مع الأخضر السريع ، والهيماتوكسيلين ، وهى متخصصة فى حالة الأنسجة الضامة وتزال منها بواسطة حامض فوسفوتنجستيك أو فوسفوموليبديك ، كما تستخدم فى حالة اعادة الصبغ فى الكحول أو فى وسط قاعدى . ويلون الفوكسين النواة بلون أحمر لامع والسيتوبلازم بنى غامق ، والفوكسين القاعدى هو البديل للحامض .

٢ــ أحمر الأليزارين

ALIZARIN RED S

صبغة حامضية تستخدم فى صبغ العظم ، وتستخدم بتركيز ٥٠٠٢ر٠ الى ١ر٠ % فى ١ % ايدروكسيد بوتاسيوم .

٣ــ أزرق الانيلين

ANILINE BLUE WS

تتركب هذه الصبغة من :

١ــ أزرق الانيلين .... ٥ر٠ جم
٢ــ حمض الأكساليك .... ٢ جم
٣ــ ماء مقطر ١٠٠ سم٣

يستخدم أزرق الانيلين كصبغة متعادلة ثم يمكن أن تتبع بالهيماتوكسيلين كما يمكن أن يليها الفوكسين الحامض ثم الفوسفوموليبديك كصبغات متعادلة للأنسجة الضامة ، كما تعمل مع صبغة البرتقالى ج ، وتدخل فى بعض التركيبات مثل صبغة مالورى ، هيدنهين ، مالورى ــ أزان . تذوب الصبغة فى الماء وتثبت بواسطة ٢ % حامض فوسفوموليبديك .

٤ـ أزوكارمين AZOCARMINE G

تتكون الصبغة من:

١ـ أزوكارمين ج .... ١ جم

٢ـ ١٪ حامض خليك ثلجي ١٠٠ سم٣

الأزوكارمين صبغة حامضية تستخدم كصبغة نووية وتدخل في تركيبات مختلفة مثل مالوري ـ أزان . وتصبغ النواة بلون أحمر.

٥ـ الفوكسين القاعدي BASIC FUCHSIN

تعتبر هذه الصبغة من الصبغات الشهيرة وتتكون من:

١ـ فوكسين قاعدي .... ١ جم

٢ـ ماء مقطر ١٠٠ سم٣

تخلط الصبغة مع الماء وتغلى ثم ترشح ويضاف ٣٠ سم ٣ حامض هيدروكلوريك ثم يضاف ١ جم صوديوم ثنائي الكبريتات أو بوتاسيوم عديد ثنائي الكبريتات. اترك المحلول لمدة ٢٤ ساعة في الوعاء. حتى يصبح رائق أصفر اللون . تحل الصبغة محل الفوكسين الحامضي وتخلط مع الأخضر السريع.

٦ـ الأيوسين EOSIN Y

الأيوسين صبغة كثيرة الاستعمال مع الهيماتوكسيلين في الهستولجي ولونها أصفر. وتستخدم على شكل محلول ٢ر٠٪ في كحول ٩٥٪ وتستخدم أيضا مع أزرق الميثيلين في صبغات الدم والأنسجة. وتستخدم أولا على شكل محلول ٢ر٠٪ ثم يستخدم أزرق الميثيلين.

٧ـ اريثروسين ERYTHROSIN

تستخدم وتستعمل نفس استخدامات صبغة الأيوسين وتستعمل على شكل محلول ٢ر٠ ٪ في كحول ٩٥٪.

٨- الأخضر السريع

FAST GREEN

تستخدم فى الصبغ بالاشتراك مع صبغات أخرى مثل الكاروبين أو فى صبغ القطاعات مع الهيماتوكسيلين أو الصفرانين ، أو مع الهيماتوكسيلين الحديدى ، أو الفوكسين الحامضى وتستخدم على شكل محلول بتركيز ٢ر٠% فى كحول ٩٥% ، وقد يصبح لونها أزرق لوجود الكحول ، وللحصول على اللون الأخضر يضاف كربونات الليثيوم الى كحول الغسيل ، واللون الازرق هو الأكثر تأثيرا مع صبغة الكارمين .

٩- أزرق الميثيلين

METHYLENE BLUE CHLORIDE

صبغة قاعدية تستخدم لصبغ النواة على شكل محلول تركيزه ٢ر٠ - ١ % . وتستخدم مع الايوسين . كما أنها مهمة جدا فى صبغ البكتريا ، والأنسجة العصبية ، وتستخدم كدليل لتقدير درجة pH كما تستخدم فى صبغ الأنسجة الغضروفية .

١٠- أخضر الميثيل

METHYL GREEN

تستخدم فى صبغ النواة فى الأنسجة الحية وتستخدم بنسبة ١ % مذابة فى ١% حامض خليك .

١١- الأحمر الوردى (المتعادل)

NEUTRAL RED

تستخدم كدليل لتقدير درجة الـ pH لونها أصفر فى المحاليل القاعديـــة ، وتعطى لون أحمر وردى فى الوسط الحامضى تستخدم فى الصبغ الحيوى عند الفحص باضافتها الى المحلول الملحى الفسيولوجى بنسبة ١ - ١٠٠٠٠ وتصبغ حبيبات السيتوبلازم فى الخلايا الحيـة ونواة الخلايا الميتة .

١٢ – البرتغالى ORANGE G

صبغة حامضية تعمل مع أزرق الميثيلين تستخدم بكثرة فى عمليات تلك الصبغ المتعدد والمتضاد Counterstain وتتبع بالهيماتوكسيلين الحديدى ، وتستخدم بنسبة ٢–٣٪ محلول مشبع من الصبغة فى كحول ٩٥٪ .

١٣ – حامض البكريك
PICRIC ACID

يستخدم فى الصبغ المتعدد والمتضاد (استخدام أكثر من صبغة) اذ يتبع بالهيماتوكسيلين الحديدى ، كما يستخدم مع الفوكسين الحامضى ، ويستخدم كمحلول مشبع فى كحول ٩٥٪ ، وتزيد قوة الصبغة عند الغسيل بالكحول .

١٤ – سفرانين SAFRANIN O

صبغة قاعدية تستخدم فى الصبغ المتعاقب والمتضاد مع الأخضر السريع وصبغ السيتوبلازم ، ويعتبر صبغة ثانوية مع الهيماتوكسيلين الحديدى مع أو بدون الأخضر السريع ، وتستخدم هذه الصبغة بكثرة فى الميكروتكنيك النباتى ويستخدم بنسبة ١ – ٥ر١ ٪ مذابة فى الماء ويمكن اضافتها مع الكحول أو يدكل ١٪ ، وتزال بواسطة ٥ر٠٪ حامض بكريك فى كحول ٩٥٪ اذا استخدم معها الأخضر السريع فى الصبغ المتعاقب تترك حتى تتعمق الأنسجة ، ويستخدم معها الأخضر السريع بنسبة ٢ر٠ فى كحول ٩٥٪ .

١٥ – سودان ٢
SUDAN II

صبغة حامضية تذوب فى الدهون ولذلك يستخدم الصبغة للدهون وهى قليلة الذوبان فى الكحول " ٤ر٠٪ " ، وتحضر على هيئة محلول مشبع . وهى مهمة فى صبغ الأنسجة الدهنية .

١٦ – أزرق التولويدين TOLUIDINE O

صبغة قاعدية يحضر بنسبة ١٪ فى الماء فى كحول ٩٥٪ لصبغ النسيج اخضر

صبغ العينات المحملة على الشرائح

STAINED WHOLE MOUNTS

يوجد نوعان من الصبغات ، نووية ، وسيتوبلازمية ، واستعمال الصبغتان معا يسمى بالصبغ المزدوج Double staining methods وقد يستخدم ثلاث صبغات أو أكثر Triple staining methods مما يساعد فى التعرف على تفاصيل أكثر للخلايا والأنسجة المختلفة وإذا استعمل أكثر من صبغة بحيث يضاد بعضها عمل الأخرى تسمى بالصبغ المضاد : Counter staining كما أن للصبغات القدرة على الاختيار Selective staining ، ويلون الهيماتوكسيلين النواة باللون الأزرق الترنقلى " بنفسجى " ، بينما يلون الأيوسين السيتوبلازم باللون الأحمر الفاتح ، والعضلات باللون الأحمر القانى ، ويلون حامض الأوزميك الأنسجة الدهنية باللون الأسود ، بينما تلونه صبغة سودان ٢ باللون الأصفر البرتقالى ، وتصبغ نترات الفضة مادة بين الخلايا باللون الرمادى أو البنى بينما لا تتأثر بها الخلايا نفسها .

١- طريقة الصبغ المزدوج بالهيماتوكسيلين والأيوسين :

تمرر الشرائح التى تم لصق القطاعات عليها بالخطوات التالية :

أ - تغمر الشرائح فى أزواج فى حوض به الزيلول لإزالة الشمع ، ثم تنقل الى أحواض بها كحولات متدرجة التركيز ١٠٠٪ ، ٩٥٪ ، ٨٠٪ ، ٧٠٪ ثم ٥٠٪ ثم ٣٠٪ ثم بعد ذلك الى الماء وهو الوسط المذاب فيه الصبغة ، وتكون تلك الأحواض المخصصة للصبغ مجهزة بأن توضع فيها الشرائح فى أزواج .

ب - تنقل الشرائح بعد ذلك الى حوض الصبغ بالهيماتوكسيلين حيث تغمر فى الصبغة لمدة (١٠ - ٢٠) ، ثم تغسل بعد ذلك مفردة فى ماء الصنبور أو تعرض لغاز النوشادر . تنقل الشرائح الى الكحول المتدرج ٣٠٪ ثم ٥٠٪ ثم ٧٠٪ ثم الى أحواض صبغة الأيوسين ثم الى كحول ٩٥٪ ثم الى ١٠٠٪ ، ثم يزال الكحول ويروق القطاع فى الزيلول .

جـ - التحميل بمادة مناسبة ثم التغطية بغطاء الشريحة والحفظ .

٢ـ طريقة الصبغ المتدرج والمتضاد :

نستخدم طريقة : MASSON'S TRIPLE STAIN

تتكون هذه الطريقة من الصبغات التالية :

١ـ محلول الصبغ رقم ١ (٥ر٠ % هيماتوكسيلين حديدي في كحول ٩٥%) .

٢ـ محلول الصبغ رقم ٢ (٢ر٠% فوكسين حامض في الماء) .

٣ـ محلول الصبغ رقم ٣ (٢ر٠% الأخضر السريع في كحول ٩٥%) .

يستخدم الهيماتوكسيلين الحديدي كصبغة أولية للأنسجة ويستخدم معها سلفات الحديديك النشادرية كمثبت للصبغة ثم بعد ذلك تصبغ العينات في الفوكسين الحامض ثم في الفوسفوملبيديك وذلك للتمييز بين أنواع الأنسجة الضامة ثم بعد ذلك يتم الصبغ في الأخضر السريع (يمكن استخدام أزرق الانيلين) .

وتتم عملية الصبغ في الخطوات التالية :

١ـ القتل والتثبيت ـ الغسيل ـ التجفيف ـ الطمر في شمع البرافين ـ التقطيع بالميكروتوم ـ لصق القطاعات على الشرائح .

٢ـ نقل الشرائح التي عليها القطاعات الى أحواض بها الماء .

٣ـ ازالة البرافين بالزيلول ثم يزال الزيلول بواسطة الكحول ١٠٠% في تمريرتان للشرائح لمدة ٥ دقائق في كل مرة .

٤ـ التجفيف في كحول متدرج ٩٥ ، ٧٠ ، ٥٠ ، ٣٠% كحول ثم الى الماء وهذه تكون في أحواض تترك بها كل تمريرة ٢ دقيقة .

٥ـ تنقل الشرائح الى محلول مثبت الصبغة " سلفات الحديديك النشادر ٢% لمدة ساعة واحدة .

٦ ـ تمرر الشرائح في الماء المقطر لمدة ٢٠ دقيقة في ٣ تمريرات .

٧ـ تنقل الى أحواض الهيماتوكسيلين الحديدي ٥ر٠% في كحول ٩٥% السابق انضاجه . لمدة ساعة ويمكن تركها طوال الليل في الصبغة .

٨ـ الغسيل في ماء جار لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة .

٩ـ تنقل الى صبغة الفوكسين الحامض ١% لمدة ٥ دقائق .

١٠ـ تمرر في ١% حامض فوسفوموليبديك حتى يختفي اللون في الأنسجة .

١١ـ الغمر في الماء المقطر ثم التجفيف في كحول ٩٥% .

١٢ـ تنقل الشرائح الى الصبغ الضاد بغمرها في ٢ر٠% أخضر سريع في كحول ٩٥% . لمدة ١٠ ـ ١٥ دقيقة ثم الغمر في كحول ٩٥% ثم الفحص .

١٣ـ التجفيف في تمريرتان في الكحول ١٠٠% .

١٤ـ يزال الكحول والترويق في الزيلول ثم التحميل والتغطية بالغطاء .

طريقة البارافين

إعداد البلوكات (إعداد بلوكات الشمع)

THE PARAFFIN METHOD

أولا : طمر الأنسجة فى البرافين INFILTRATION AND EMBEDDING

وتشتمل هذه الطريقة على طمر أنسجة الكائنات نباتية أو حيوانية فى شمع البرافين لتكوين بلوكات يسهل تقطيعها الى قطاعات بالميكروتوم وتستخدم هذه الطريقة فى جميع الأعضاء النباتية والحيوانية أما العظم والغضروف فيستخدم لها طريقة السليلوز ، وفى حالة الأنسجة الدهنية يستخدم لها طريقة التجميد .

الخطوات العامة فى عملية الطمر فى البرافين :

١ــ التجفيف Dehydration

نظرا لأن البرافين لا يختلط ولا يذوب فى الماء يلزم اجراء عملية التجفيف للأنسجة والتخلص من الماء . ويتم التجفيف باستبدال الماء بواسطة كحول ايثايل ، والتجفيف يتم تدريجيا حتى لا يتسبب ذلك فى اتلاف الأنسجة والخلايا وذلك بتسلسل امرار الأنسجة فى تركيزات متدرجة من الكحول ٣٠٪ ، ٤٠٪ ، ٥٠٪ ، ٧٠٪ ثم ٩٥٪ ثم فى تركيزان من الكحول المطلق ١٠٠٪ وهذه تعطى نتائج فى عملية التجفيف للأنسجة ، ويفضل أن يكون حجم النسيج النباتى أو الحيوانى لا يزيد قطره عن ٦ مم وتبلغ المدة التى تمرر بها الأنسجة فى كل تركيز من الكحول ٢٠ ــ ٣٠ دقيقة ، والبلوكات الكبيرة تترك لمدة أطول ويجب أن لا تترك مدة طويلة فى تركيزات أقل من ٢٠ ٪ اذ يجب أن لا تقل تركيز الكحول فى حالة الحفظ عن ٨٠٪ وكحول الايثايل هو المجفف المثالى ويمكن استخدام البدائل مثل كحول الميثايل ، كحول ايزوبروبايل ، والأسيتون .

٢ــ ازالة الكحول من الأنسجة (أو الترويق) : Dealcoholization or Clearing

يتم فى هذه الخطوة ازالة الكحول من الأنسجة (نباتية أو حيوانية)

واسيف اله بمذيب آخر يسمح للبرانين أن يذوب فيه وللكحول أن يذوب فيه أيضا ، والتليول ، والزيلول ، والكلوفورم هى المذيبات المستخدمة فى ازالة الكحول من الأنسجة وأكثرها استعمالا هو الزيلول ، وازالة الكحول تتم بعد التمريرة الثانية للأنسجة فى كحول مطلق (١٠٠٪) وذلك بالامرار فى خليط ١:١ كحول مطلق + زيلول ثم الامرار مرتان فى زيلول نقى . وتختلف المدة التى تمرر فيها الأنسجة (تبعا للنوع) ، وحتى لايتسبب ضرر للنسيج يمرر النسيج بالتدريج من الكحول الى الزيلول بنسبة ٢:١ ثم ١:١ ثم ١:٢ قبل التمرير فى الزيلول النقى أو الكلوفورم ويمكن استخدام البنزين لنفس الغرض ويمكن استخدام داى أوكسان بديلا عن الكحول والزيلول بامرار العينات فيها لمدة ٢٤ ــ ٤٨ ساعة .

وعند ازالة الكحول من مواد ضعيفة مثل البراعم والأجنة والكبد والطحال تمرر بعد ازالة الكحول (الترويق) فى زيت التربينول أو زيت السيدر ولا يوصى بهذه العملية فى كل عمل لصعوبة ازالة هذه الزيوت من الأنسجة .

ويطلق على عملية ازالة الكحول " بالترويق " ويرجع هذا الى أن المذيبات تجعل القطاع شفاف ، واذا لم يتم الترويق تعاد الأنسجة ثانية الى كحول ١٠٠٪ .

٣ــ تشبع الأنسجة بالبرانين : Infiltration

ان عملية تشبع الأنسجة والخلايا بشمع البرانين يتم باستبدال بالكحول ويحل محله الشمع فى النسيج والخلايا ، ويمرر النسيج فى محلول مزيل للكحول مخلوطا بالبرانين ، ويوضع الخليط داخل الفرن درجة حرارته أعلى من درجة انصهار الشمع ٦٥ ْم (بزيادة ٢ ــ ٥ درجات) . ثم يمرر بعد ذلك مرتان على الأقل فى شمع نقى ومدة التمرير للنسيج المعامل ٢٠ ــ ٤٠ دقيقة فى كل مرة . والبلوكات الكبيرة تظل مدة طويلة مغمورة فى الشمع . واذا مرت العينات فى زيت ثقيل مثل السيدر أو التربينول أو غيرها يجب أن يتم تمريرها فى الشمع ٥ ــ ٦ مرات ويكون النقل من الزيت الى زيلول ــ برانين.

كبداية لعملية التشمع بشمع البرافين .

PARAFFIN WAX شمع البرافـــين

ان الشـموع المستخدمة فى الدراسات الهستولوجية لعمل القطاعات هو شمع البرافين ويمكن اضافة شمع النحل بنسبة ١% ـ ٢% لتحسين خواص القطع . ويباع هذا الشمع فى المكاتـب العلمية الخاصة ببيع الأجهزة العلمية والكيماويات ، كما يوجد لدى مصانع التعليب للأغذية . . وتوجد أنواع مختلفة تبعـا لدرجة الانصهار تتراوح بين ٥٢ ـ ٥٤°م الى ٦٤ ـ ٦٦°م ويتوسطهم النوع ذو درجة الانصهار ٥٦ ـ ٥٨°م وهوالأكثر استخداما فى الدراسات الميكروتكنيكية اذ يعطى قطاعات قطرهـا بين ٥ ـ ١٥ ميكرون ، ودرجة الانصهار العالية تفيد فى حالة القطاعات الدقيقة أوعند التقطيع فى درجة حرارة عالية أما درجة الانصهار المنخفضة فتفيد فى حالة القطاعات السميكة .

ويستخدم الشمع ذو درجـة الانصهار ٥٢ ـ ٥٤°م عند عمل قطاعات ١٦ ـ ٢٥ ميكرون وعند التقطيع على درجة حرارة المعمل العادية . ويضبط فرن صهر الشمع على درجـة ٥٥ ـ ٥٨°م

ويستخدم الشمع ذو درجة الانصهار ٥٦ ـ ٥٨°م عند عمل قطاعات ٥ ـ ١٥ ميكرون ويكون التقطيع على درجة الحرارة العادية . ويضبط فرن الشمع على درجة ٥٨°م .

ويستخدم الشمع ذو درجـة الانصهار ٦٠ ـ ٦٢ م عنـد التقطيع على ١ ـ ٥ ميكرون ويكون التقطيع على درجـة الحرارة العادية داخل المعمل ويضبط الفرن على ٦٢ م .

وبصفة عامة اذا كان التقطيع يجرى فى الصيف يستخدم شمـع درجة انصهاره عالية . واذا كان التقطيع سيتم فى الشتاء يستخدم شمع ذو درجـة انصهاره منخفضـة .

ويستخدم فرن مزدوج الجدار يسخن بالماء الساخن لهذا الغرض .

ويستخدم أكواب معدنية أو زجاجية لتسييح الشمع وتدهن بجليسرين قبل الاستخدام حتى يسهل ازالة البرافين منها .

ويفضل أن يحتوى الفرن على مروحـة لتوزيع الهواء فيه .

٤ـ الطمر فى الشمع: Embedding in wax

تستخدم أطباق بترى صغيرة قطرها ٢ بوصة توضع بها الشمع والأنسجة لعملية التشبع لسهولة التعامل مع الأنسجة والبرافين ويمكن دهان هذه الأطباق بالجليسرين حتى يمكن ازالته منها بعد ذلك وعند التعامل مع هذه الأطباق بعد اخراجها من الفرن توضع على سطح ساخن (حرارته أعلى من درجة انصهار الشمع بـ ٢ ـ ٥ ْ م) يجهز قوارب ورقية من ورق مصقول كما هو موضح بالشكل المرفق باستخدام بوك خشبى ليسهل تجميعه حوله

توضع كمية من الشمع المنصهر فى القارب الورقى الموضوع على سطح ساخن أيضا ثم يوضع النسيج أو العضو المحامل المنقول من الشمع الى القارب ثم يكمل الصب فوقه بالشمع حتى يملأ كل الفراغ فوقه . ويجب أن يكون النسيج فى المنتصف والمسافة بينه وبين جدار القارب الورقى ٢ ـ ٣ مم ويغطى بارتفاع من ٤ ـ ٥ مم . (شكل) .

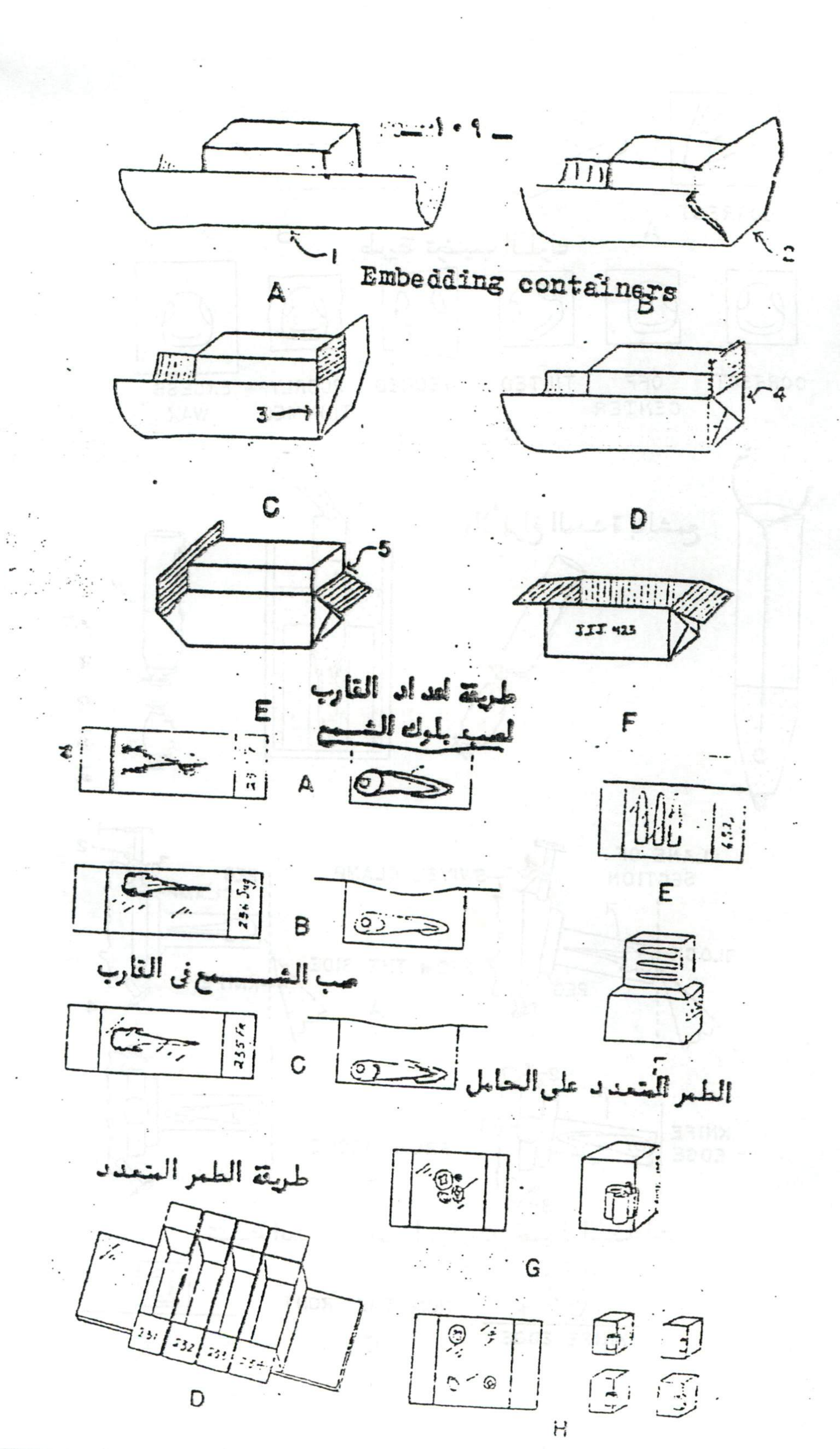
ترقم القوارب الورقيـة على جانبيها بنوع العملية ونوع النسيج وتكتب البيانات على ورق وتغمس فى شمع كما سبق فى موضوع الترقيم والتعليم .

بعد انتهاء الطمر والصب فى القوارب تنقل الى أطباق بها ثلج أو الى ثلاجة لتجميد الشمع حتى اجراء عملية التقطيع وكلما طالت مدة حفظ البلوكات فى الثلاجة أعطت نتائج أفضل فى عملية التقطيع بالميكروتوم وفى الصبغ عن حفظ العينات فى الكحول .

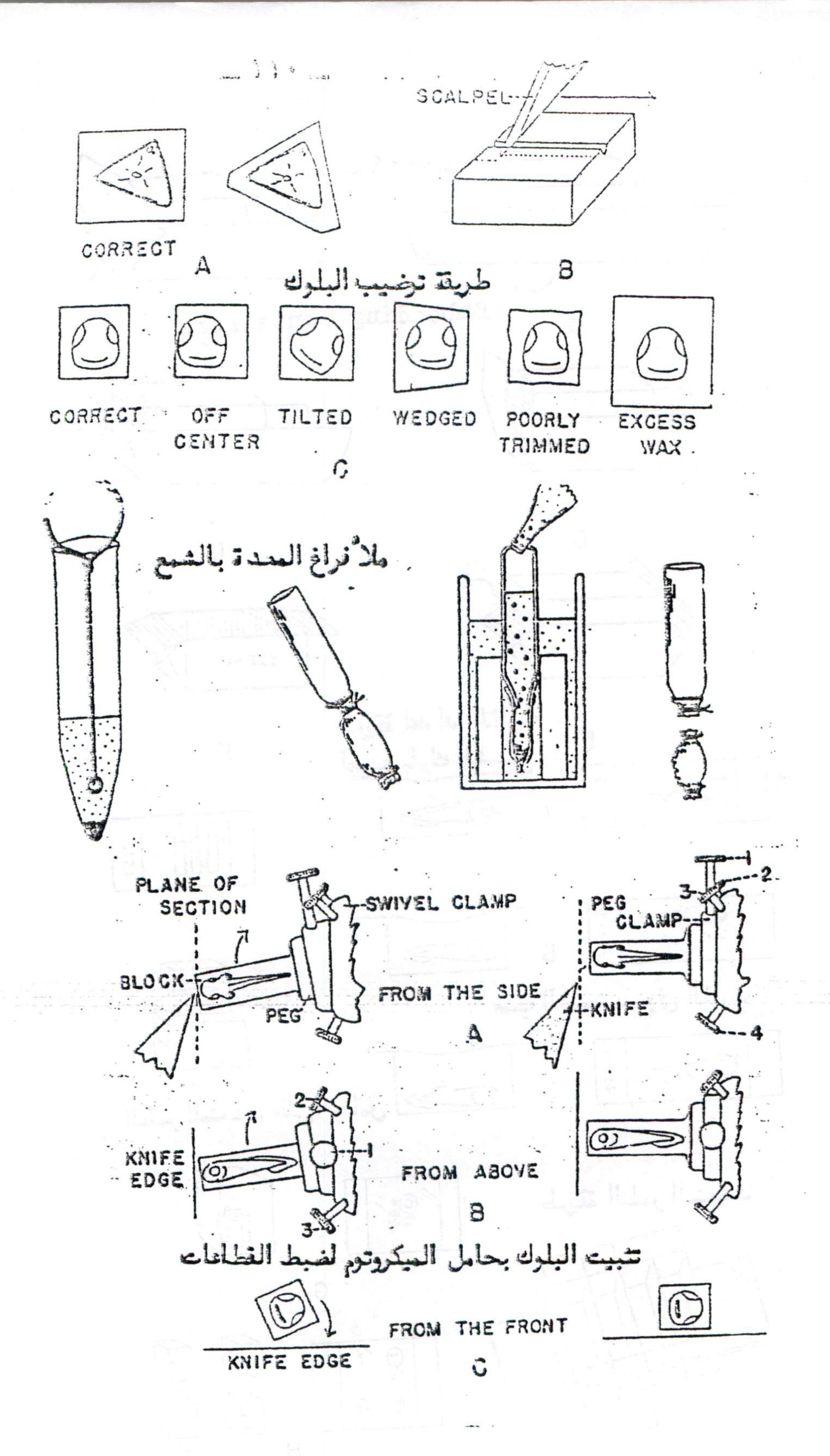
وقد يجرى طريقة الطمر المتعدد فى البرافين فى قارب واحد أو فى عدة قوارب كما هو موضح بالشكل .

٥ـ تهذيب البلوكات الشمعية وتثبيتها فى حامل الميكروتوم :

تجهز البلوكات الشمعية التى حفظت فى الثلاجة لتأخذ الشكل الذى يتفق مع شكل النسيج كما هو موضح بالشكل ويثبت فى حامل البلسلوك الذى يثبت بالميكروتوم (شكل) .



Embedding containers
A
B
C
D
E
F
طريقة لعداد القارب
لصب بلوك الشمع
A
B
صب الشمع فى القارب
C
E
الطمر المتعدد على الحامل
طريقة الطمر المتعدد
G
D
H


SCALPEL
CORRECT
A
B
طريقة تخضيب البلوك
CORRECT
OFF CENTER
TILTED
WEDGED
POORLY TRIMMED
EXCESS WAX
C
ملأ فراغ المعدة بالشمع
PLANE OF SECTION
SWIVEL CLAMP
BLOCK
PEG
FROM THE SIDE
A
PEG
CLAMP
KNIFE
KNIFE EDGE
FROM ABOVE
B
تثبيت البلوك بحامل الميكروتوم لضبط القطاعات
FROM THE FRONT
KNIFE EDGE
C

بعض أخطاء الطمر فى البرافين وتلافيها

Embedding Difficulties

عند عمل البلوكات أثناء طمر الانسجة فى البرافين وهى :

١ـ وجود مساحات بيضاء ناتجة عن عدم جودة ازالة الكحول (الترويق) وحدوث تجمد للمذيبات داخل البلوكات ، وتعالج باعادة التصميح للشمع وتمرير الانسجة مرتان داخل برافين نقى ثم اعادة الصب.

٢ـ حدوث تكسر فى البلوكات وعدم استواء الجوانب، تعالج باعادة تصحيح الجزء المكسور باستخدام "ملقط" ساخن تلحم به الاجزاء التى تكسرت أو خالية من شمع البرافين.

٣ـ وجود سطح غير مستوى نتيجة الغمر السريع للشمع فى الماء البارد ويتم ذلك بتسخين السطح بواسطة "ملقط" ساخن والتسوية واضافة شمع منصهر اذا لزم الامر.

٤ـ انخفاض السطح ووصوله الى النسيج ويتم علاج ذلك باعادة الصهر والصب.

٥ـ وجود ماء فى البلوك ، وتزال بواسطة ملقط ساخن.

٦ـ وجود فراغات هوائية فى وسط البلوك نتيجة الصب على البارد ، وتتلافى ذلك بوضع القوارب على سطح ساخن.

SECTIONING

ثانيا : التقطيع وعمل القطاعات: تقطيع العينات

بعد الحصول على النسيج مطمورا فى بلوك الشمع يمكن الحصول منها على القطاعات بطريقتان :

١ـ باليد : وذلك بتثبيت الكتلة المطمورة فى فيها النسيج نباتى كان أو حيوان وان كانت أكثر شيوعا فى النبات لسهولة التقطيع ، وتجرى التقطيع بواسطة موسى حادة ساخنة ، مع التمرن حتى تحصل على أدق قطاعات وهذه تحتاج الى الصبر والمران المستمر.

وتعمل القطاعات اليدوية فى النبات وهو طازج وذلك بمسك الجزء من الساق . أو الجذر باليد وتطع قطاعات بالموس وتوضع فى طبق بترى بـه كحول ٧٠ ٪ وتميز القطاعات الرهيفة الطافية أما السميكة فتترك ثم ترفع القطاعات المختارة لاجراء عملية الصبغ والتحميل ، ويمكن الاستعانة بالجزر أو البطاطس توضع بينهم النسيج النباتى للمساعدة على التقطيع .

٢ـ عمل القطاعات بالميكروتوم اليدوى :

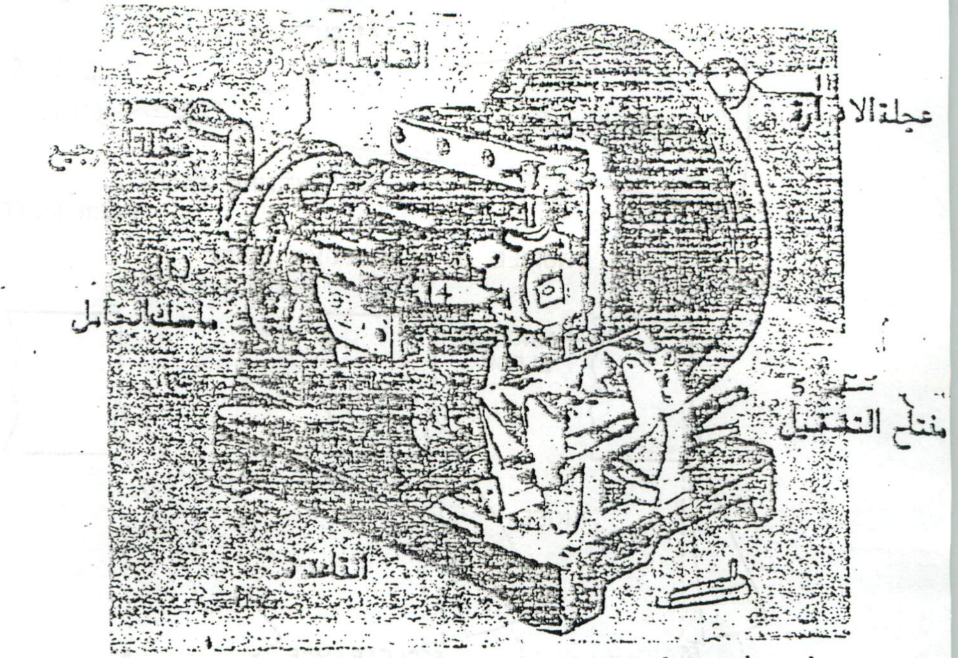
يعطى نتائج تشبه طريقة التقطيع اليدوى وبه جزء تمسك به البلوك وسكينة علوية تتحرك فى اتجاه واحد ويتغير سمك القطاع مع كل مرة بواسطة تحريك الاسطوانة المحوية لضبط السمك .

٣ ـ الميكروتوم الترددى الاتوماتيكى :

لا يخلو معمل ميكروتكنيك من هذا الميكروتوم (شكل)
ويتركب من ١ـ عجلة الادارة وهذه تدار يدويا أو أوتوماتيكيا بالكهرباء
٢ـ عجلة خلفية للترجيع لسحب حامل البلوك بعيدا عن السكين أو عند تركيب حامل القطاع .
٣ـ عجلة ميكرومترية لتحديد قطر القطاع بالميكرون (الميكرون $\frac{1}{1000}$ م)
٤ـ ماسك حامل البلوك الشمعى .
٥ـ مفتاح الايقاف والتشغيل . ٦ـ السكين فى المقدمة .

والميكروتوم مثبت على قاعدة ثابتة ثقيلة من الحديد الصلب حتى لا يهتز أثناء التقطيع .

السكين : هو أهم جزء فى الميكروتوم ولذلك يجب المحافظة عليه وابقائها نظيفة بعد التقطيع باستخدام الزيلول وقطعة قماش ناعم كما يجب سنها والمحافظة عليها حادة ، وتركب بزاوية تسمح بالحصول على شكل القطاع المطلوب كما يوضحه الشكل المرفق (شكل) .



. The Spencer rotary microtome (AO model 815; photograph

الميـــــــكروتوم

ســـكين الميكروتوم

AFFIXATIVE

FLOATING MEDIUM

مثبت القطاعات فوق الشريحة

A

نقل القطاعات الى الشرائح

B

34° CUTTING FACET

سكين الميكروتوم

16° WEDGE

34° CUTTING FACET OF WORN KNIFE

PROFILE OF MICROTOME KNIFE

A

PARAFFIN BLOCK

KNIFE

5°

15°

5° CLEARANCE ANGLE

23° KNIFE ANGLE

5°

45°

زاوايا زوايا التقطيع

RIGHT

BLOCK

VENTRAL

KNIFE

سكين الميكرو:

SECTIONS

A

JJF 102

صينية القطاعات

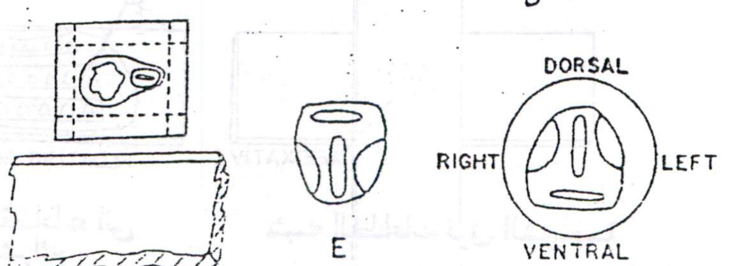
SECTION TRAY

C

الشريحة ومساحة الغطاء

COVER GLASS AREA

D



طريقة اجراء التقطيع واعداد الميكروتوم للعمل

تتبع الخطوات التالية :

١- يجب التعرف على كل أجزاء الميكروتوم وطريقة تشغيل كل جزء به حتى يمكن حل كل مشكلة فى التشغيل تواجه الفنى .

٢- تجهز صوانى معدنية لاستقبال القطاعات يمكن وضعها على سطح ساخن ويستعمل الماء الدافىء والجليسرين لفرد القطاعات عليها .

٣- يجب توفر فرشتان أو أكثر شعر الجمل نمرة ٣ ، ٥ مدببة الطرف .

٤- يكون وضع الميكروتوم بحيث تكون عجلة الادارة فى الجهة التى على يمين المشغل والسكين على الشمال وتجهز الشرائح على منضدة مجاورة .

٥- يجهز الميكروتوم بضبطه على السمك المطلوب ، ويتحدد سمك ذلك بناء على نوع النسيج ونوع الدراسة المقررة . ومعظم اللافقاريات والثديات تقطع على سمك ٧-١٠ ميكرون . وعندما يكون الغرض من الدراسة هو دراسة تركيب الميتاكوندريا فى السيتوبلازم يلزم التعامل مع قطاعات دقيقة من ٣ - ٥ ميكرون . أما فى حالة دراسة التركيب العام للأنسجة والأجنة والخلايا تتكون القطاعات من ١٢ - ٢٥ ميكرون .

٦- تستعمل عجلة الترجيع الخلفية لسحب الماسك للحامل فوق السكين .

٧- يغلق مفتاح تشغيل عجلة الادارة .

٨- يدفع الحامل الميكروتومى Peg المثبت به بلوك الشمع ويصحح اتجاه القطع بضبط زاوية الحامل مع زاوية حد السكين .

٩- تفتح عجلة الادارة ويجرب سمك القطع حتى الضبط .

١٠- استمر فى التشغيل طالما القطاعات تنتج بصورة عادية وبدون أخطاء .

١١- تنقل شرائط القطاعات أولا بأول الى صوانى القطاعات وترقم .

العيوب التى تظهر أثناء التقطيع وعلاجها

Problems Encounted in Sectioning

١- عدم التصاق القطاعات ببعضها لتكوين شريط متصل ، وذلك يرجع الى عدم حدة السكين ، عدم تثبيت كتلة الشمع جيدا أو عدم موازاتها لحافة السكين ، أو برودة الحجرة التى يجرى فيها التقطيع وتعالج بتلافى ماسبق .

٢ــ القطاعات بها خدوش طولية ويرجع ذلك الى تسنن حد السكين أو تغطيته ببقايا غريبة كألياف القطن مثلا أو بقايا القطاعات. وتعالج بامرار قطعة مبللة بالزيلول بقطعة من الكتان. وسن السكين.

٣ــ التواء شريط القطاعات، ويرجع الى عدم توازي السطحين العلوي والسفلي لبلوك الشمع. أو تعرض الكتلة لجزء غير حاد من جهة الحافة القاطعة، وتعالج بتشذيب سطحي الكتلة العلوي والسفلي حتى يصبحا متوازيين وتحريك السكين لابعاد الجزء الغير حاد عن مواجهة.

٤ــ التواء الشريط الى أعلى عند ادارة الميكروتوم وتكسره عند حافة السكين ويرجع ذلك الى ميل السكين ميلا زائدا. وتعالج بضبط ميل السكين حتى يصبح قريبا من العمودي.

٥ــ تطبق القطاعات : السبب في ذلك أن السكين غير حاد أوالبارافين عجيني طري، وتعالج بصقل وسن السكين وتبريد كتلة الشمع بالماء البارد.

٦ــ عدم انتظام سمك القطاعات : ويرجع ذلك الى عدم تثبيت السكين جيدا ــ عدم ضبط الميكروتوم ــ حامل البلوك غير مربوط جيدا. وتعالج بتلافي الأسباب السابقة.

٧ــ تمزق القطاعات : حيث يتسبب عن حافة السكين غير الحادة وعدم اتقان تشبع وتشرب النسيج بالشمع. وتعالج بسن السكين واعادة صهر بلوك الشمع والتمرير مرتان في شمع برافين نقي.

٨ــ التصاق القطاعات بالسكين : نتيجة استخدام برافين درجة انصهاره منخفضة جدا والمعمل درجة حرارته مرتفعة أثناء التقطيع، وتعالج بعمل قطاعات سميكة ــ وتبريد معمل التقطيع، واستعمال شمع ذو درجة انصهار عالية.

٩ــ سماع صوت معدني أثناء التقطيع ويرجع الى الادارة البطيئة أو زيادة ميل السكين فتسبب احتكاك وتعالج بتلافي ماسبق. وذلك بزيادة سرعة الميكروتوم وضبط ميل السكين ومنع الاحتكاك.

١٠ - وجود مناطق سميكة وأخرى رقيقة فى كل قطاع:
ويرجع ذلك الى اهتزاز السكين بسبب شدة الميل أو صلابة العينة ، وتعالج بضبط ميل السكين وطلاء سطح الكتلة بالسيلودين .

١١ - وجود ثقوب بالقطاعات : ويرجع ذلك الى وجود فقاعات هواء بالبلوكات الشمعية نتيجة لعدم اتقان تشبع النسيج بالشمع وعدم جودة الصب فى القوالب الورقية . وتعالج بإعادة الصب بعد تمريرها فى شمع نقى مرتان .

(شكل) بعض الأخطاء الشائعة فى التقطيع

Common difficulties encountered in sectioning.

حفظ القطاعات والبلوكات بعد التقطيع:

يمكن حفظ القطاعات التى تم الحصول عليها والمرصوصة فى صوانى التقطيع بعد وضع البيانات عليها ، وتحفظ فى ثلاجة ، أو فى مكان بارد بعيدا عن الاتربة وحتى التثبيت واللصق على الشرائح .

كما يمكن حفظ البلوكات الباقية والأجزاء الباقية بعد التقطيع ومعها حوامل القطاعات المكتوب عليها البيانات الخاصة بالنسيج ، وتحفظ فى مكان بارد جاف لا يصل اليه الماء .

ثالثا : تثبيت القطاعات على الشرائح واعدادها

Affixing and Processing the sections

قبل اجراء تثبيت القطاعات على الشرائح واعدادها لخطوات تالية لتجهيزها للفحص الميكروسكوبى النهائى ، فانه يتم فرد تلك القطاعات وفصلها عن بعضها ويتم ذلك بعمل حمام مائى لهذا الغرض وتتم أيضا على أسطح الشرائح مع استخدام ماء مقطر دافئ مخلوط بالجليسرين ويجرى الفرد والتثبيت (اللصق) للقطاعات قبل اجراء العمليات التالية بيوم واحد على الأقل ، ويمكن حفظ الشرائح بعد لصق القطاعات عليها بشرط أن تكون بعيدا عن الاتربة .

١ـ تثبيت ولصق القطاعات على الشرائح الزجاجية :

Affixatives of Slides

يستخدم للصق القطاعات تركيبتان مشهورتان للصق القطاعات هما :

أ ـ لاصق هوبت Haupt's Affixative

يتركب من :

١ـ ماء مقطر	....	١٠٠ سم٣
٢ـ جيلاتين	....	١ جم
٣ـ فينول (بللورات)	....	٢ جم
٤ـ جليسرين	....	١٥ سم٣

يذاب الجيلاتين فى الماء الدافئ ، ثم يضاف الفينول ثم الجليسرين

ثم الترشيح ، ويستخدم هذا اللاصق مع الفورمالين بنسبة ٢٪
فورمالين لبقى القطاع مفرودا على شكل فيلم ويمنع غسيل اللاصق
أثناء عملية تمريرات الشرائح بعد ذلك ٠

ب ـ لاصق ماير Mayer's Affixat

يتركب هذا اللاصق: ١ـ ألبيومين البيض٠٠٠٠٠٠ ٥ سم٣
٢ـ جليسرين ٠٠٠٠٠٠٠٠٠٠ ٥ سم٣
٣ـ سلسيلات ٠٠٠٠٠٠٠٠٠ ١ جم

تجهز برجها مع بعض ثم الترشيح ويكون الترشيح بطىء جدا
ويستخدم هذا اللاصق مع الماء المقطر ويخلى الماء المقطر قبل
استخدامه فى عملية الفرد ٠

مسطحات التسخين : Hot plate

تستخدم مسطحات أثناء اللصق والتعامل مع القطاعات توضع عليها
الصوانى المملوءة بالقطاعات ، درجة حرارتها أقل من درجة حرارة
الانصهار للبرافين ٠

٢ـ طرق تحضير العينات للفحص الميكروسكوبى : ـ

(اعداد وتجهيز القطاعات الملصوقة على الشرائح)

تمر الشرائح الملصوق عليها القطاعات بسبعة خطوات هى :ـ
١ـ ازالة البرافين من القطاعات: Deparaffining

نظرا لأن معظم الصبغات توجد فى شكل محاليل مائية وقليل
منها توجد فى كحول ، لذا يلزم التخلص من البرافين باجراء امرارها
فى الزيلول النقى حتى يتم التخلص من الشمع ومدة التمرير ٥ دقائق
فى كل مرة ٠

٢ـ ازالة الزيلول من القطاعات: Deparaffining solution

وذلك بامرار الشرائح التى عليها القطاعات تمريرتان من الكحول المطلق ١٠٠% ومدة التمريرة ٥ د قائق .

٣ـ التجفيف : Hydration

فى حالة وجود محلول الصبغ فى الماء فان الشرائح يجب تجفيفها بامرارها فى كحول ٩٥% ثم ٧٠ % ثم ٥٠% ثم ٣٠% ثم الى الماء المقطر والنقل من تركيز كحول ٩٥% فانه يسبب تلف لنسيج القطاع ومدة التمرير فى كل تركيز ٢ ـ ٣ د قائق .

٤ـ الصبغ: Staining

تنقل الشرائح بقطاعاتها الى طريقة الصبغ المختارة بتمريرها فى أحواض الصبغ كما ذكر فى صـــ ٧٢ باستخدام الصبغ الفردى أو الصبغ المزدوج أو المتعاقب الثلاثى . (انظر الشكل المرفق) .

٥ـ اعادة التجفيف ونزع الماء: Dehydration

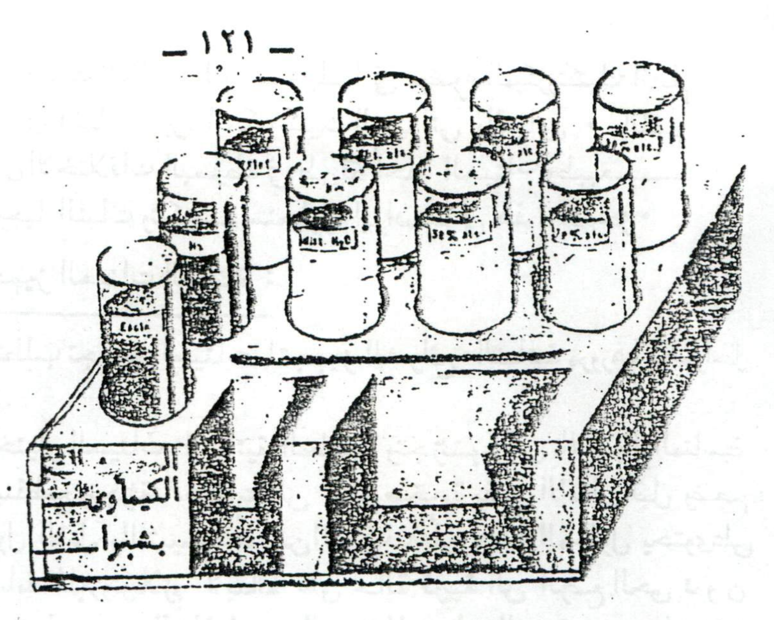
يلزم اعداد القطاعات للفحص الميكروسكوبى بتحميل القطاعات فى مادة لاتؤثر على النسيج وفى نفس الوقت لاتذوب فى الماء وتسمح بمرور الضوء من خلالها . وتتم بامرار القطاعات فى فى تركيزات متدرجة من الكحول ٣٠% ، ثم ٥٠% ، ثم ٧٠% ، ثم ٩٥% ثم مرتان فى ١٠٠% كحول ، وتترك الشرائح فى كل تمريرة ٢ـ٣ د قائق ومدة ٥ د قائق فى تمريرات ٩٥% ، ١٠٠% كحول .

٦ـ نزع الكحول والترويق: Dealcoholization and clear

يتم نزع الكحول والترويق باستخدام الزيلول أو أحد المذيبات الاخرى مثل التولوين والبنزين والكلوروفورم ، ولكن وجد أن أفضلها هو الزيلول لانه يروق الأنسجة ولايسبب تكسرها أو جفافها الشديد .

٧ـ التحميل والتغطية بغطاء الشريحة: Mounting the cover

سبق شرح طريقة التحميل وبصفة عامة يستخدم كندا بلسم فى عملية التحميل وتغطى بغطاء الشريحة باحتراس دون ترك فراغات هوائية فى التحميل بين الغطاء والنسيج حتى لايتسبب فى تلفه وعدم جودة الفحص الميكروسكوبى ، ثم يجرى التجفيف فى فرن خاص وتلصق بيانات القطاعات على الشريحة وتحفظ فى علب الشرائح التى توضع فى دولاب خاص.



A battery for staining a paraffin section.

بطارية أنابيب صبغ القطاعات بالمعمل

القطاع مصبوغ ومحمل

Stained section

Paraffin section

قطاع البرافين

5–10 m. in tap water

٥ ــ ١٠ دقائق
فى مياه الحنفية

XYLOL (2–3 m. / 3–5 m.)

ABS. ALC. (1 m. / 1–2 m.)

ABS. ALC. (1 m. / 1–2 m.)

90% ALC. (1 m. / 1–2 m.)

70% ALC. (1–2 m. / 1/2 m.)

50% ALC. (1–2 m. / 1/2 m.)

DIST. H_2O (1–2 m. / 1/2 m.)

Hx. (2–5 m.)

EOSIN (1–3 m.)

Diagram to demonstrate the successive steps done to stain a paraffin section with haematoxylin & eosin

: Diagrammatic illustration of the different steps done to stain a paraffin section.

المعلومات السابقة التي تسجيلها في موضوع الميكروتكنيك العام لا يوجد أي اختلاف بين الميكروتكنيك الحيواني والنباتي ، اللهم الا بعض الاختلافات البسيطة في طريقة أخذ العينات وطبيعة ومورفولوجيا النبات وتركيبه سنحاول ايرادها في هذا الموجز .

تجهيز العينات النباتية :

يتطلب تجهيز العينات لتجهيز الشرائح النباتية مرورها بالمراحل الآتية :

١- اختيار العينات النباتية المطلوبة وتجزئتها الى الأحجام المناسبة وذلك بتقطيع وتجزئة العينات الى قطع صغيرة بقدر الامكان قبل وضعها في محلول القتل والتثبيت لانه من المعروف أن هذا المحلول يحتوي على مواد سامة للبروتوبلازم لابقائه على حالة قريبة الى الوضع الحي دون أن يؤثر على حجم الخلايا . وبالنسبة للعينات الغضة تستعمل شفرة حادة وتوضع العينة النباتية على ورق الترشيح المبلل بالماء مع عدم الضغط على العينة أثناء التقطيع . وتختلف العينة حسب الغرض من الدراسة التي يجريها الباحث " مورفولوجية وتشريحية ، اصابة مرضية وغيرها " . وتوضع الأجزاء في الماء أثناء التقطيع أو في أجزاء مرطبة بالماء لحين الانتهاء من القطع فتوضع جميع الأجزاء دفعة واحدة في محلول التثبيت .

واذا أراد الباحث عزل نسيج نباتي معين أو عدد من الأنسجة من جسم النبات وتفكيك خلاياها فان هذه العملية تسمى طريقة التفكيك : وتعتمد هذه الطريقة على اذابة المادة اللاصقة للخلايا والتي تعرف باسم أو الصفيحة الوسطى ويمكن عمل ذلك باحدى الطرق الكيميائية الآتية :

أ- طريقة أوكسالات الأمونيوم :

وفيها تقطع الأجزاء النباتية طوليا الى قطع صغيرة وتحفظ في خليط من : حامض يدكل مركز بنسبة ١ جزء
كحول ايثايل ٣ جزء لمدة ٢٤ ساعة

ثم تغسل الأنسجة في ماء مقطر ثم تنقل الى محلول ٥ر٠٪ أوكسالات الأمونيوم على الشرائح في محلول الأوكسالات الامونيوم وبالطرق الخفيف على غطاء الشريحة تتفكك الخلايا وتتباعد عن بعضها البعض ، يمكن .

الفحص والدراسة . وهذه الطريقة تناسب الأجزاء النباتية الغضة .

ب - طريقة جفرى :

يستعمل فيها حامض نتريك قوة ١٠ ٪ وحامض كروميك قوة ١٠ ٪ وذلك بنسبة ١ : ١ . تقطع الأجزاء الخشبية الى كتل صغيرة وتوضع فى الخليط لمدة ٢٤ ساعة ثم تغسل القطع بعد خروجها من المحلول وتحمل على الشرائح .

ج - طريقة فرانكلين :

عبارة عن خليط من فوق اكسيد الهيدروجين " ماء ثقيل " وحامض خليك ثلجى بنسبة ١ : ١ توضع المكعبات الخشبية الصغيرة فى الخليط وتغلى ببطء تحت لهب حتى يبيض لونها وتحمل الأجزاء على الشريحة وتفحص للدراسة .

هـ - طريقة انزيم البكتيناز :

يستخدم الانزيم فى صورة محلول مائى ١ ٪ لتفكيك الخلايا عن بعضها عند درجة حرارة ٣٧ - ٤٠ م لمدة ١٠ - ١٥ ساعة حيث يؤثر الانزيم على مادة بكتات الكالسيوم وهذه المادة هى التى تتكون منها الصفيحة الوسطى التى تعمل كمادة لاصقة للخلايا . وهذه الطريقة تفيد فى فصل الخلايا واختبارها فى زراعة الأنسجة

نسيج البشرة :

عند دراسة نسيج البشرة فان ذلك يتم عادة بعمل سلخ فى الطبقة الخارجية من جسم النبات (طبقة البشرة
وطريقة عمل السلخ تتم يدويا بواسطة موسى حادة وملقاط (مع التمرن) وذلك لدراسة فتحات الثغور وما عليها من طبقة الأدمة
و شعيرات وقشور وأنواع البلورات وشكل جدر خلايا البشرة .

بعد اعداد السلخ من العينة المراد فحصها ودراستها تتم عملية الترويق Clearing لهذا السلخ بواسطة وضعه فى حامض اللاكتيك Lactic acid ويسخن على لهب حتى تزال المواد الملونة التى توجد داخل الخلايا ، ثم يفحص القطاع أو السلخ وهو محضر على الشريحة الزجاجية .

وفى حالة صعوبة عمل السلخ فى نسيج بشرة بعض النباتات مثل النباتات النجيلية والنخيلية وبعض النباتات الباذنجانية فينصح بأخذ قطعة من نصل ورقة دون اللجوء الى عمل سلخ ووضعها على الشريحة وتغمر فى حامض لاكتيك ثم تسخن حتى الغليان ، وتكرر العملية حتى يتخلص القطاع من المواد الملونة ويصبح شفاف ثم تترك الشريحة لتبرد ثم يبدأ الفحص الميكروسكوبى . ويمكن استخدام هذه الطريقة فى حالة تتبع مسار الأنسجة التوصيلية فى جسم النبات بأن تحفظ الأنسجة النباتية فى حمض اللاكتيك مدة تتراوح مابين ١٢ ــ ٣٦ ساعة عند درجة حرارة تتراوح مابين ٤٠ ــ ٥٠ ْم حسب صلابة الأنسجة النباتية . وعند معاملة هذه الأنسجة بالصبغ بمواد حساسة لمادة اللجنين المميزة للعناصر الخشبية فان الحزم الوعائية يمكن أن تتميز عن بقية أنسجة النبات وبذلك يسهل تتبع مسارها فى كل جسم النبات حتى دون اللجوء الى الفحص الميكروسكوبى .

ويمكن استخدام بعض المواد اللاصقة مثل فى عمل سلخ من البشرة التى لا يمكن عمل سلخ فيها بالطريقة اليدوية ويطلق عليها طريقة " البصمة " . تعامل البشرة بهذه المادة ثم تترك لتجف ثم تنزع ومعها نسيج البشرة بما عليها من شعيرات وما بها من شعيرات " مثل الاكلادور " تنعمل على نزع البشرة وتوضع هذه على الشريحة وتحمل فى مادة الجلى جليسرين أو فى عدم وجودها مع نقطة من الماء اذا كان التحضير مؤقتا ثم الفحص الميكروسكوبى بعد ذلك .

٢ــ القتل والتثبيت :

لا يختلف عن ماذكر فى هذا الباب ص ٣٦ وغيرها فى محتوى هذا الكتاب .

٣ــ الغسيل : كما ذكر سابقا فى معاملة العينات فى موضوع التثبيت .

٤ــ التجفيف :

٥ــ التدعيم : أو التشبيع بالبرافين :

٦ــ الطمر فى البرافين :

٧ــ التقطيع : كما سبق باستخدام طرق التقطيع السابقة .

أنواع القطاعات النباتية :

تختلف أنواع القطاعات النباتية حسب نوع الدراسة كما يلى :

١ـ قطاعات عرضية :

يكون اتجاه عمل القطاع فى هذه القطاعات عموديا على المحور الطولى للعضو النباتى لغرض دراسة طبقات القطاع الخاصة .

٢ـ قطاعات طولية قطرية :

وفيها يكون القطاع موازيا للمحور الطولى فى العضو النباتى ويمـر بمركزه وذلك لغرض دراسة مسار أى نوع من الخلايا ومعرفة وظيفتها فى مركز القطاع .

٣ـ قطاعات طوليـة تماسية :

يعمل القطاع موازيا للمحور الطولى فى العضو النباتى ولكن لا يمـر بالمركز وذلك لغرض دراسة نوع معين من الخلايا .

٤ـ قطاعات مائلة :

هذا النوع من القطاعات قليل الاستعمال فى الدراسات التشريحيـة حيث أنها لا تعطى صورة حقيقية عن التركيب التشريحى للعضو النباتى عند مستوى معين وانما توضح تركيبه عند عدة مستويات فى آن واحـد مما قد يتسبب فى الاختلاط للتركيب التشريحى عند هذه المستويات . وتستخدم فقط لدراسة التفاصيل التركيبية للأخشاب النباتية .

٥ـ قطاعات عمودية :

وهى تقابل القطاعات العرضية فى حالة الأعضاء النباتية المفلطحة مثل أنصال الأوراق والسوق الورقية ويمر القطاع بسطح العضـو والغرض منه دراسة الطبقات المختلفة للنبات .

وتحضر هذه القطاعات بطرق مختلفة :

١ـ الطريقة اليدوية :

٢ ـ طريقة الميكروتوم :

المرض النباتى هو انحراف عن النمو الطبيعى للنبات يظهر فى صورة اختلال فسيولوجى أو تغير فى التركيب الطبيعى للنبات أو أى جزء من أجزائه يؤثر تأثيرا ضارا على النبات أو أى جزء من أجزائه مقللا من قيمته الاقتصادية . وينتج المرض عن اضطراب بين التوازن بين العائل والظروف المحيطة به . وعند تشخيص حالة مرضية على النبات يستلزم الأمر اجراء بعض الدراسات والاختبارات وهذه تتم فى الصورة التالية :

١ ـ دراسة المرض فى مكان ظهور الاصابة :

ويتم ذلك بتسجيل علامات وأعراض المرض على أن تشمل الدراسة أجزاء النبات سواء الهوائية منها أو الأرضية مع مقارنة النباتات المصابة بالنباتات السليمة مع معرفة الظروف المحيطة بالنباتات ونوع النباتات والتربة وهل المرض عام الانتشار وهل الانتقال يتم من التربة أو الأجزاء الهوائية . مع معرفة المحاصيل السابقة فى الدورة الزراعية وسابقة ظهور المرض فى نفس المنطقة . مصدر التقاوى وتاريخ وطريقة الزراعة والمعاملات الزراعية من خدمة وري وتسميد والأمراض والحشرات التى أصيب بها المحصول . واذا لم تكفى هذه الوسائل للتعرف على المرض نلجأ الى الطرق المعملية .

٢ ـ دراسة المرض فى المعمل :

النباتات التى تؤخذ للدراسة فى المعمل يجب أن تشمل نباتات كاملة وأجزاء مختلفة من النباتات وأن تمثل النباتات المراد فحصها درجات مختلفة من الاصابة وكذلك نباتات سليمة للمقارنة وعند ارسال العينات لمسافات بعيدة تلف جيدا فى ورق مبلل وترسل بأسرع ما يمكن. فى المعمل تحفظ رطبة وباردة لحين الفحص. وعند الحاجة لاطالة مدة الفحص تحفظ العينات فى محاليل الحفظ السابقة التى أهمها الكحول والكلوروفورم وغيرها . أو توضع مباشرة فى محاليل القتل والتثبيت . وعند فحص الاعراض يتم ذلك بالميكروسكوب وتصور ويتم ذلك بواحد أو أكثر من الطرق الآتية :

١ ـ الكشط : ٢ ـ السلخ : ٣ ـ السحق :
٤ ـ القطع : ٥ ـ القتل والتثبيت ٦ ـ التجفيف
٧ ـ ازالة الكحول ٨ ـ التشبيع بشمع البرافين
٩ ـ الطمر فى شمع البرافين ١٠ ـ التقطيع بالميكروتوم

١١ـ لصق القطاعات بالشرائح ١٢ـ ازالة الشمعن القطاعات

١٣ـ صبغ الشرائح بالصبغات المناسبة

وفي هذا الجزء نضيف أنه توجد نظريتان لفعل الصبغة :

١ـ النظرية الطبيعية :

والصبغات فى هذه الحالة تذوب فى المادة التى تصبغها كما يحدث عند صبغ المواد الدهنية بصبغة سودان ٢ أو أن الصبغة يحدث لها ادمصاص أو تجمع على سطح النسيج المصبوغ .

٢ـ النظرية الكيميائية :

وفيها يحدث تفاعل كيماوى فيتحد الجزء الملون من الصبغة ببعض أجزاء البروتوبلازم . وتقسم الصبغات تبعا الى فعلها الكيمائى الى أ ـ الصبغات القاعدية : وهى الصبغات التى تتكون من جزء ملون قاعدى عضوى متحدة مع أصول حامضية غير ملونة عادة خلات أو كلوريدات أو كبريتات وتصبغ الصبغات القاعدية الأجزاء الحامضية الغنية بحامض الميتا نوسفوريك وهذه الصبغات قد تذوب فى الماء أو الكحول ومنها صبغة " صفرانين " وهيماتوكسيلين .

ب ـ الصبغات الحامضية : هى الصبغات التى تتكون من جزء قاعدى معدنى غير ملون عادة صوديوم أو بوتاسيوم متحد مع أصل حامضى عضوى ملون ومن هذه الصبغات " الأيوسين "

وكما سبق القول يلزم وجود مادة مثبتة للصبغة لتمام مفعول الصبغة ويتم معاملة النسيج النباتى للمواد المثبتة للون أولا ثم يأتى بعد ذلك الصبغ .

١٤ـ التحميل المستديم : ويستخدم فية الجليسرين جيلى كماسبق .

وبذلك يتضح أن الخطوات الخاصة بتحضير شريحة نباتيـة لاتختلف عن اتباع الخطوات العامة السابقة .

ميكروتكنيك مفصليات الأرجل

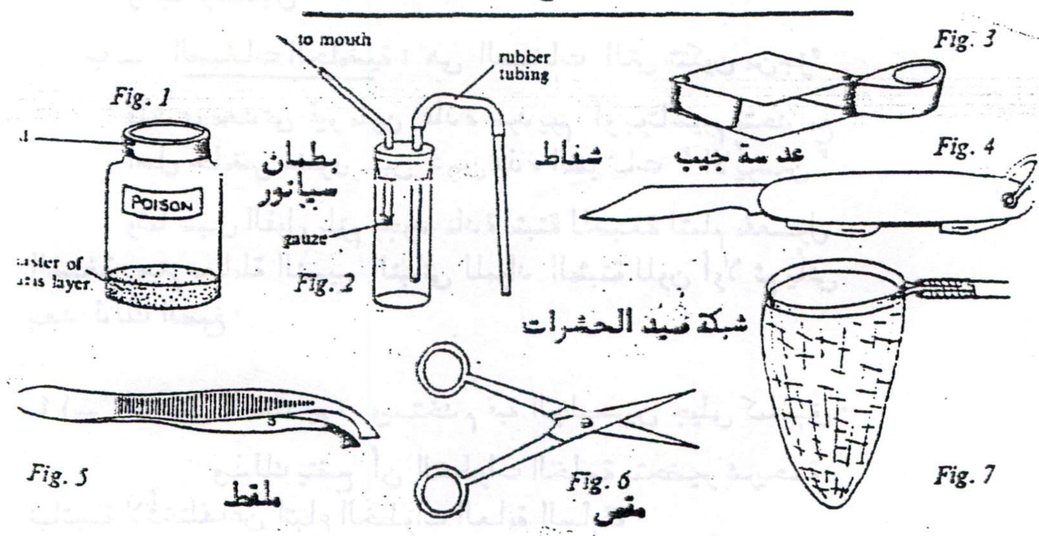
الميكروتكنيك الحشري

فى هذا الجزء سنتناول دراسة مختصرة للعمليات التى تجرى فى معامل الحشرات لاعداد وتجهيز العينات الحشرية وطرق تجهيز النماذج العلمية وعينات العرض للمجموعة الحشرية والشرائح الخاصة بدراسة الحشرات :

١ – جمع الحشرات : INSECT COLLECTION

يوجد العديد من الحشرات التى يمكن جمعها ومن المناسب جمع عدد مناسب من كل نوع لعمل المجموعة الحشرية أو عند اجراء دراسة تصنيفية أو الدراسة الفسيلوجية والبيلوجية مع تمثيل الذكور والاناث والأطوار المختلفة للحشرات ، وتمثل الرتب الحشرية المختلفة ، ويجب أن تعبر المجموعة عن الغرض الذى تجمع من أجله بمعنى أن طالب الزراعة يجمع الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية الزراعية والحشرات ذات الأهمية الطبية لحيوانات المزرعة ، ويسجل كل البيانات الممكنة للتعرف على اسم المحصول أو تلك المحاصيل التى جمعت منها الحشرات أو أماكن تواجدها فى مساكن الحيوان وتوضح نسبة الاصابة والضرر الذى تصيبه ، والموسم الذى تتكاثر فيه وغير ذلك من المعلومات الضرورية .

الأدوات اللازمة لعملية جمع الحشرات وتصنيفها :



١ـ برطمان السيانور (أو أخضر بـ ريس) لقتل العينات الحشرية •

٢ـ شناط للحشرات الرهيفة مثل الطفيليات والتربس•

٣ـ عدسة جيب للفحص الأولى بالحقل •

٤ـ مشرط أو مدية أو مطواة صغيرة لعمل القطاعات فى النبات للحصول على الأطوار الحشرية •

٥ـ ملقط : ويمكن استخدام أكثر من حجم ونوع منها •

٦ـ مقص لأخذ العينات النباتية مثل الاصابات الورقية أوأجزاء النبات•

٧ـ شبكة صيد الحشرات•

بالاضافة الى بعض الأدوات الأخرى التى يلزم توفرها بالمعمل مثل أدوات التشريح التى ذكرت فى صـ ١٥ ، بالاضافة الى أدوات حفظ وتحميل الحشرات وغيرها •

طرق جمع الحشرات: COLLECTING METHODS

١ـ الجمع باليد : Hand Picking

تستخدم هذه الطريقة فى حالة جمع الحشرات الكبيرة الحجم مثل الخنافس ونطاطات الأوراق ، هذه الحشرات تجمع يدويا وتوضع فى الأوعية الخاصة بها بحفظها أو قتلها ، كذلك بعض أنواع البق يمكن جمعها بهـذه الطريقة ، فى حالة وجود حشرات صغيرة على بعض الأوراق أو الأفرع الصغيرة وهذه تقطع بما عليها من حشرات وتوضع فى الأوعية•

٢ـ الجمع باستخدام الشباك: Sweeping by net

تصنع شبكة من البفتة بقطر ٣٠ ـ ٤٠ سم وطول ٦٥ سم وتدعم الفتحة بواسطة حلقة معدنية ، اليد طولها ٤٥ سم ـ ٦٠ سم وتستخدم لجمع معظم الحشرات مثل البق والنطاطات والمن وغيره من الحشرات البطيئة وللجمع العام " وتسمى طريقة الكنسات" •

٣ ـ شبكة الحشرات والفراشات Insect net & Butterfly net

تشبه السابقة الا أنها تتكون من قماش النايلون " ناموسية " تستخدم لصيد الفراشات وأبى دقيقات ومعظم الحشرات الطائرة ، وأبعادها كالسابقة ولكن اتصالها بالفتحة المعدنية يكون بحلقة من البفتة وتستخدم هذه الشبكة فى الأوقات المشمسة وبعد الظهر لجمع الحشرات الطائرة•

Method of holding an insect net when catching an insect.

٤ـ جمع الحشرات بهز الأفرع المصابة والأوراق: Beating

يتم هز الجزء المصاب بالطرق الشديد عليه مع وضع ما يشبه الشمسية أو وعاء تحت الفرع مثل طريقة الحصول على طرد نحل متعلق بالفرع ·

٥ـ مصائد الحشرات : Insect Trapping

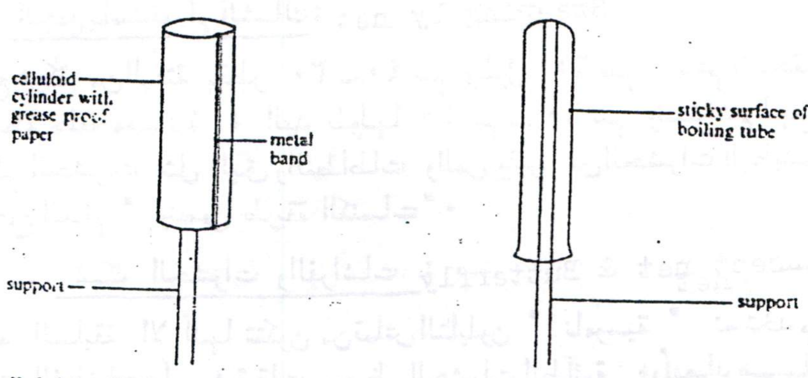
تستخدم فى جمع الحشرات الليلية فى حالة عدم وجود الجامع وأنواع المصائد هى :

أـ المصائد الضوئية : Light Traps

تستخدم للحشرات الليلية وتتكون من مصدر للضوء قوى ووعاء لجمع الحشرات وقتلها ·

ب ـ المصائد اللاصقة : Sticky traps

وتستخدم فى الحشرات النشيطة ليلا ونهارا وتستخدم مادة لاصقة توضع على مصائد على ارتفاعات مختلفة وتزال الحشرات اللاصقة وتوضع محلول حفظ (كحول ٧٠ ٪) ·



A celluloid cylinder sticky trap.

A boiling tube sticky trap.

جـ ـ مصائد الطعوم السامة أو المصائد الجنسية :

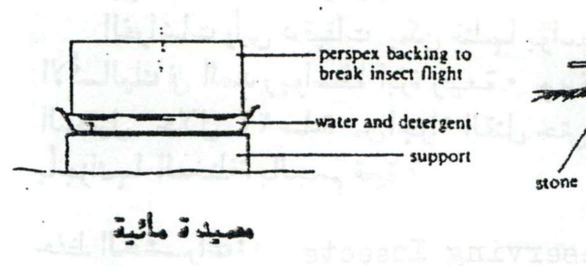
وتستخدم فى مكافحة ذبابة الفاكهة وقد تستخدم بوضع الفورمونات الجنسية لجذب الذكور فى الحشرات وجمعها وقتلها حتى تفشل فى تلقيح الاناث ·

د ـ المصائد المائية : Water traps

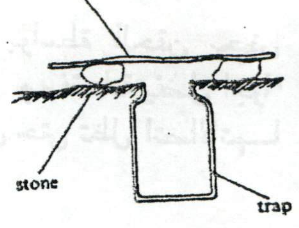
تستخدم المصائد المائية فى المناطق الغير ممطرة وتوضع فى وسط المحاصيل وتوضع بها بعض التى تمنع التوتر السطحى وتساعد على خنق الحشرات وتستخدم فى حالة الزيادات الكبيرة للحشرات الطائرة ، كماتستخدم فى صيد البراغيث فى الريف المصرى .

هـ ـ مصائد الحفر : Pitfall traps

ونيهايد فى برطمان أو وعاء وتكون فوهته فى مستوى سطح التربة ويغطى بغطاء مرفوع عن مستوى الارض بواسطة قطع من الحجارة وتجمع الحشرات الساقطة وتحفظ ، وتفيد فى حالة حشرات التربة .



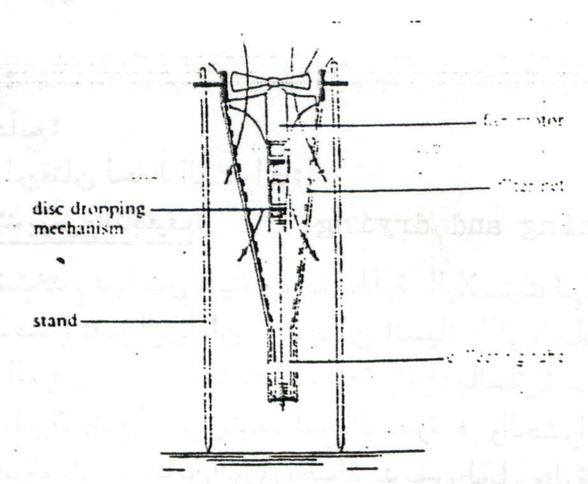
مصيدة مائية



مصيدة الحفرة

و ـ مصائد الشفط : Suction traps

وتعمل بنفس فكرة الشفط للهواء الموجودة فى المكنسة الكهربائية .
وأشهرها مصيدة جونسون الموضحة بالشكل .



Arrows indicate direction of air flow.

قتل الحشرات: Killing Insects

تستخدم طرق عدة لقتل الحشرات باستخدام برطمان مناسب يوضع في قاعدته مادة السيانور "سيانيد البوتاسيوم" أو أخضر باريس ثم طبقة من الجبس تسمح بمرور غاز المبيد ويمكن أن يبلل طبقة الجبس بالكلوروفورم أو الكحول لقتل الحشرات بفعلها ويضع شرائح ورق على سطح الجبس لتجفيف الحشرات المقتولة • ولاتترك الحشرات أكثر من ٢٠ دقيقة داخل البرطمان حتى لاتفقد لونها الطبيعي اذا تركت مدة طويلة ، ويجهز البرطمان بوضع قطعة مبللة بواسطة خلات الايثايل •

الفراشات وأبي دقيقات يمكن قتلها بواسطة الحقن بحمض الأكساليك في الصدر بواسطة ابرة رفيعة • وبصفة عامة يفضل اجراء التحميل خلال ٢٤ ساعة من اجراء القتل حتى تظل اتصالاتها بأجزائها المختلفة بالجسم قوية •

حفظ الحشـرات: Preserving Insects

توجد طريقتان لحفظ الحشرات وفي أي منها لابد من تسجيل البيانات على الحشرات المجموعة تتضمن :

اسم الحشرة: "الاسم العلمي"

اسم المحصول :

المنطقة

التاريخ :

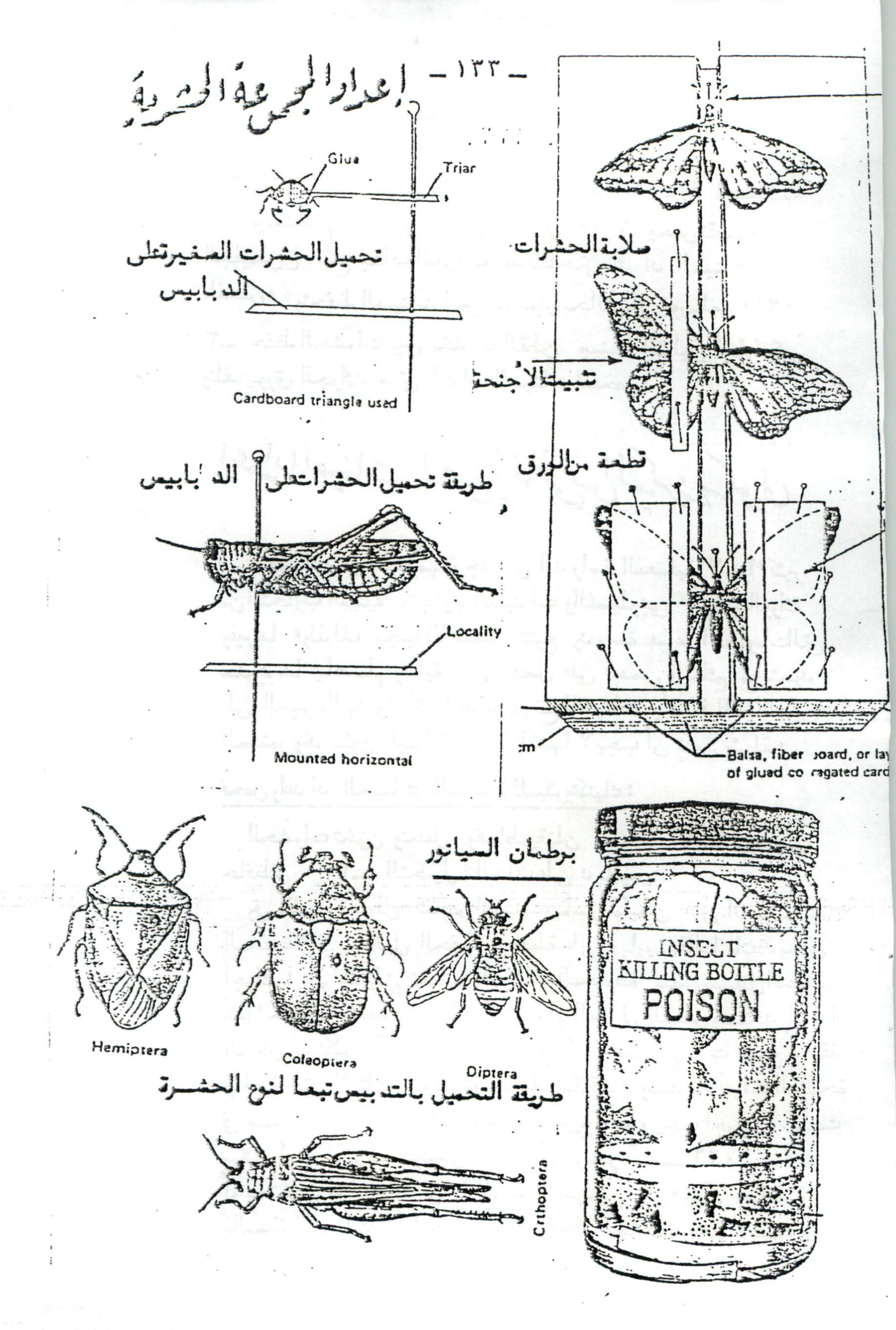
اسم الجامع:

وتوجد طريقتان لحفظ الحشرات:

١ـ التدبيس والتجفيف: Pinning and drying

وتستخدم دبابيس معينة رفيعة مطلية بالبلاستيك لها نمر مختلفة وتنقل الحشرات من البرطمان "برطمان السيانور" الى الصلابة الموضحة بالشكل المرفق) وتثبت الأجنحة وتترك بالصلابة حتى تجف وتختلف طريقة وضع الدبوس تبعا لنوع الحشرة ، والحشرات الصغيرة توضع ملصوقة على مثلث من الورق محمولة بدبوس طويل وعلية البيانات•

إعداد المجموعة الحشرية



٢- حفظ الحشرات في المحاليل : Pickled Specimens

ويستخدم لذلك برطمان به كحول ٧٠ % وبعض نقط من الجليسرين لمنع جفاف العينات : وذلك حتى اعداد العينات للفحص، وتحفظ العينات التى ستعرض بحالتها في فورمالين ١٠%.

٣- حفظ الحشرات بين مخدات القطن وبينها نفثالين أو بارادكس وتلف بورق الجرائد حتى اعداد العينات للفحص.

إعداد العينات الحشرية للفحص الميكروسكوبي

الحشرات حيوانات مهمة جدا في الدراسة المعملية لاجراء كثير من التجارب البيئية وتجارب المبيدات والفسيلوجي وتجارب الوراثة وغيرها ،ولذلك يجب الاهتمام بتتبع ودراسة هذه المعلومات التى سنوردها باهتمام وعناية حتى نحصل على أحسن النتائج مع التعود على الصبر والهدوء أثناء التعامل مع العينات ويأتي ذلك بالتمرين المستمر وقد تكون البداية صعبة ولكنها لا يجب أن تكون مثبطة .

فحص واعداد العينات الحشرية للميكروتكنيك :

الحشرات تخزن وتحمل وهما طريقتان : ١- الحفظ في سوائل حافظة ٢- التحميل الجاف على دبابيس.

في أغلب الأحوال تفحص العينات بأسرع مايمكن لأن الحشرات المحفوظة في محاليل الحفظ أو محملة على دبابيس غالبا ماتفقد بعض أجزائها ولذلك يلزم تغطية العينات المحفوظة بنفس سائل الحفظ أثناء حفظها وفحصها ويمكن استخدام الماء في الفحص ويستخدم لهذا الغرض بيونكلر " ميكروسكوب تشريح " وتستخدم آلات تشريح دقيقة مبططة حتى لا تتلف العينات وخاصة الملاقط . وتفيد الأدوات الموضحة في ص ٥١ ، ٩٧ . وعملية التشريح هذه يجب اجرائها تحت سائل أو محلول فسيلولوجي " محلول رنجر " ص ٢٦ .

أو يستخدم محلول ملحي " كلوريد الصوديوم ٠,٦ % " وخاصة بالنسبة للعينات الطازجة ، أما المحفوظة يجب تشريحها تحت

محلول كحولى ٥٠ ٪ ، وأيضا بالنسبة للعينات الطازجة يمكن غمرها فى كحول ١٠ ٪ وذلك قبل وضعها فى الماء لأن الكحول يساعد الماء على ترطيب أسطح الجسم فى الحشرات وتغطى العينات بالمحاليل بحيث تسمح باجراء عملية التشريح بدون أى زيادة فى سائل التشريح وبحيث لا تعرق عملية التشريح .

والحشرات ومفصليات الأرجل مثل جميع اللافقاريات تشرح من للجهة الظهرية وذلك لأن الحبل العصبى يقع بطنيا ، وفى حالة الحشرات الصغيرة التى يصعب تشريحها مثل المن والتربس فانه يلزم توافر الميكروسكوب أثناء الفحص أو التشريح . ويلزم توافر أدوات التشريح بحالة جيدة مسنونة ونظيفة قبل وبعد التشريح .

وعند الرغبة فى تحضير شرائح علمية من أجزاء خارجية وداخلية من الحشرات أو مفصليات الأرجل فيجب فصلها ووضعها مباشرة فى محلول القتل والتثبيت أو فى محلول ٧٠ كحول لحين نقلها الى محلول التثبيت .

إعداد العينات وتحميلها على الشرائح

أولا : اعداد وتجهيز زوائد الحشرات :

تمرر هذه الأجزاء بعد التشريح أو استخراجها من محاليل الحفظ بالخطوات التالية بالمعمل :

١ـ **التطرية :** Maceration

فى الأجزاء الصلبة ذات الكيوتيكل السميك تغمر فى ايدروكسيد صوديوم ٥ ـ ١٠ ٪ ويمكن رفعها على لهب لزيادة الفعالية وتوضع فى المحلول بعض الدبابيس لمنع الطرطشة وتترك فى هذا المحلول ٢٠ دقيقة وخاصة فى الأجزاء السميكة ثم تغسل بالماء ويضاف اليه بضع نقط من حمض الخليك الثلجى .

٢ـ **التجفيف :** Dehydration

تمرر العينات الموجودة فى الماء المحمض بحمض الخليك الثلجى الى محاليل كحولية " كحول ايثيلى " متدرج التركيز لمدد محددة تبعا لنوع وسمك الزوائد كالآتى :

٣٠٪ كحول لمدة	٥ ـ ١٠ دقائق
٥٠٪ كحول لمدة	٨ ـ ١٠ دقائق
٧٠٪ كحول لمدة	١٠ ـ ١٥ دقيقة

٩٠٪ كحول لمدة	....	١٥ ــ ٢٠ دقيقة
٩٨٪ كحول لمدة	....	١٥ ــ ٢٠ دقيقة
٩٩ــ١٠٠٪كحول لمدة	....	٢٠ ــ ٣٠ دقيقة

تقلب العينات بواسطة الملقط أثناء امرارها لاختراق الكحول كل أجزاء العينات .

الترويــق:

٣ــ الترويق: Clearing

يتم الترويق بواسطة الزيلول ، فبعد اخراج العينات من الكحول المطلق(١٠٠٪ كحول) توضع على ورق ترشيح لازالة الموجود بها ثم تغمر فى الزيلين لمدة ١٥ ــ ٢٠ دقيقة ويجب عدم تركها مدة طويلة فى الزيلين حتى لاتتهتك وتلف العينات .

٤ــ الصبغ: Staining

قد تحمل العينات بدون صبغ اذا كان الغرض من الدراسة تقسيمى أما اذا كان هناك رغبة فى الدراسة الدقيقة وخاصة فى الدراسة المورفولوجيــة فيجرى الصبغ باحدى الصبغات المذكورة سابقاً وذلك بامرار العينات فى كحول بعد الترويق ثم وضع الصبغة على الشريحة فوق العينة ثم تغسل بعد الصبغ بالكحول ، وتروق ثانية بالزيلول وتحمل .

٥ــ التحميــل: Mounting

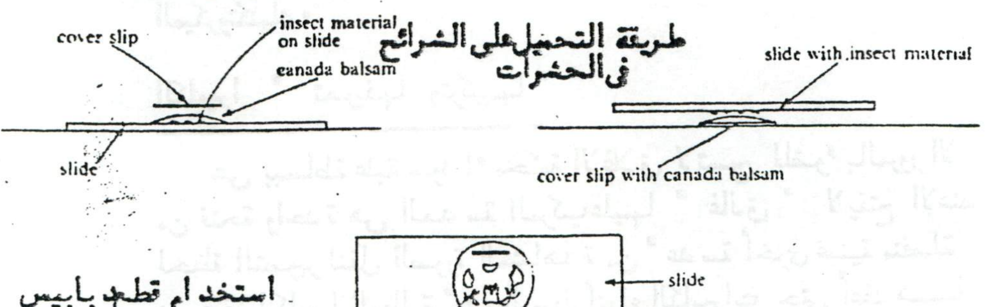
يجرى التحميل للعينات باستخدام " كندا بلسم " وتستخدم لهذا الغرض شرائح نظيفة وأغطية نظيفة وتفرش جزء من كندا بلسم على الشريحة وترص العينات بحسب ترتيبها كما فى أجزاء الفم أو الأرجل ثم تترك لتجف جزئيا لمدة ١٠ ــ ١٥ دقيقة بجوار لمبة الميكروسكوب أو فى فرن خاص ثم يجرى تنقيط لكندابلسم حتى يتم التغطية بعناية تامة بحيث يلمس غطاء الشريحة الذى يمال بواسطة ابرة التشريح حتى تغطى ولاتتكون فقاقيع هوائية . وفى حالة الأجزاء السميكة تستخدم طريقة الحلقــة كماهو موضح بالشكل ( ) .

ثانيا : عمل القطاعات فى أطوار الحشرات المختلفــة :

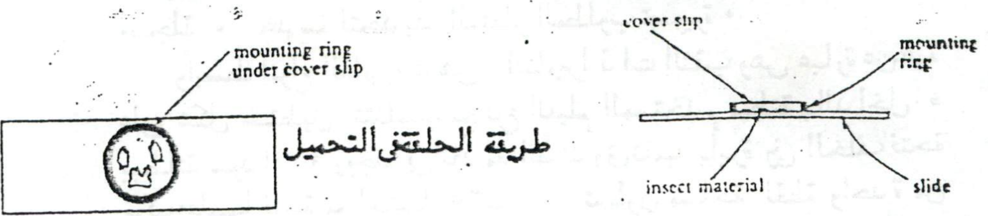
تتبع فى هذه الطريقــة الميكروتكنيك العام المستخدم فى اعد اد القطاعات بطريقــة البرافين وتمر بالمراحل السابقة الملخصة كما يلى :

١ـ القتل والتثبيت : بعد جمع العينات تغمر فى احدى محاليل القتل أو التثبيت أو تنقل من محلول الحفظ الى محلول التثبيت .
٢ـ التجفيف : بامرار العينات فى تركيزات متدرجة من الكحول .
٣ـ ازالة الكحول والترويق : ويستخدم للترويق الزيلول كماسبق .
٤ـ التشبيع بشمع البرافين :
٥ـ الطمر فى شمع البرافين : ويلاحظ تجزئة العينات الكبيرة .
٦ـ عمل القطاعات بالميكروتوم :
٧ـ مراحل مابعد التقطيع : من لصق القطاعات ، والتخلص من الشمع ثم ازالة الزيلول من القطاعات (انظر صـ ٨٨) . حتى تصل الى التحميل النهائى .

Mounting a specimen on a slide–

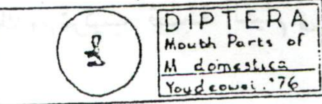


Using chips of glass or pins for mounting thick entomological specimens.



Using a mounting ring for mounting thick entomological specimens.

Section through slide with mounting ring.



A finished slide.

التصوير العلمى

مقدمة :

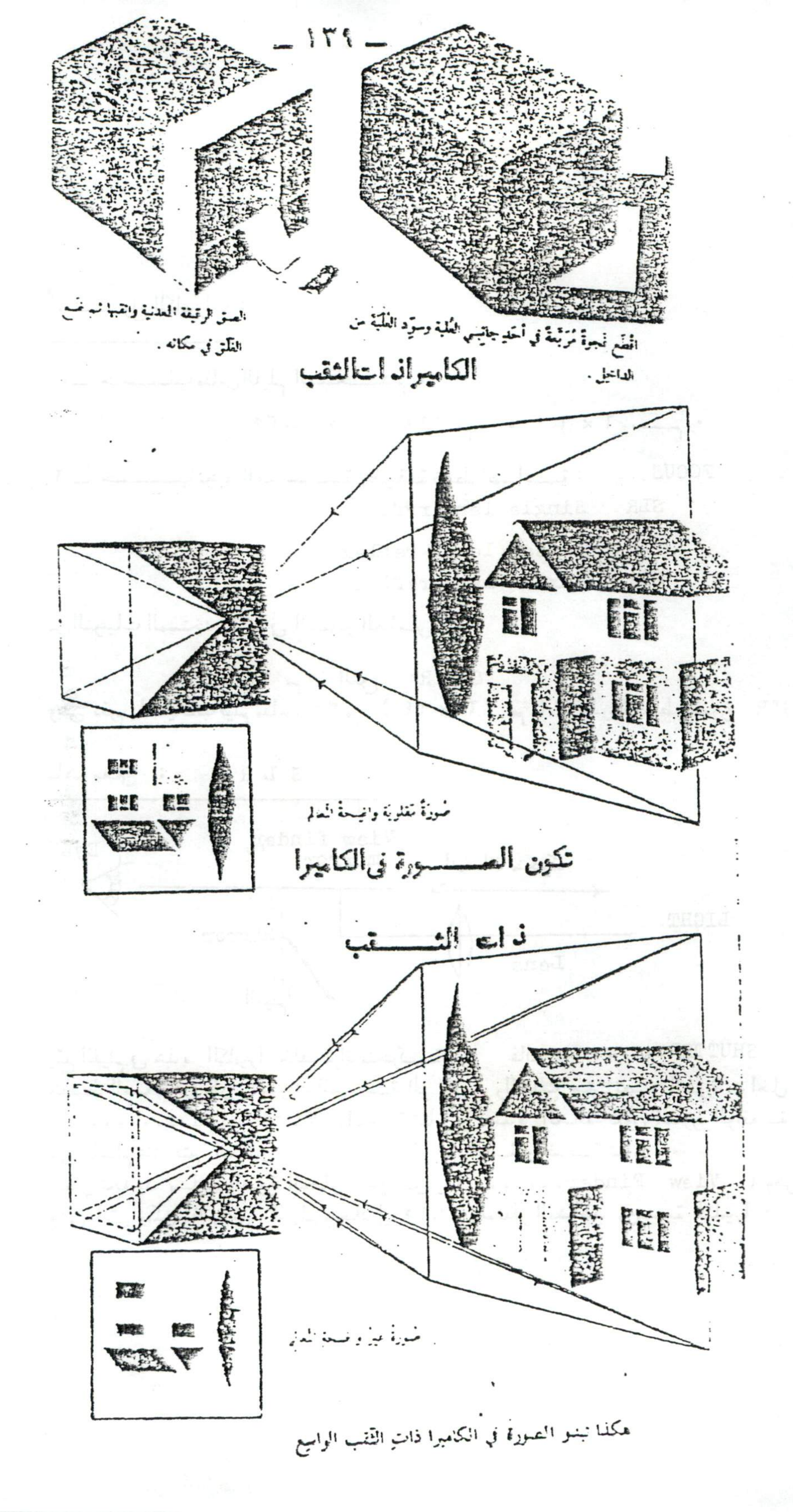
الغرض من دراسة التصوير العلمى هو الاستفادة من المعلومات والخبرة فى مجال التصوير العام وتطويعها لخدمة العملية التعليمية اذ أن الوسائل التعليمية والدراسة الدقيقة لمكونات ودقائق الخلايا تم التعرف عليها بوسائل التصوير الميكروسكوبى المختلفة وكان لاكتشاف الميكروسكوب الالكترونى الاثر الهائل فى تقدم التصوير العلمى وأخيرا استخدام أشعة الليزر فى التصوير تعتبر معجزة العصر الحديث •

وفى موضوعنا هذا سوف نشير الى تطور التصوير بصفة عامة مع التعرف على أجزاء الكاميرا وتركيب الفيلم وطريقة التصوير الميكروسكوبى الذى يهمنا بالدرجة الأولى فى هذا المقرر لما لعلاقته باظهار نتائج عمل الميكروتكنيك •

الكاميرا " تعريفها وتركيبها "

هى ببساطة علبة سوداء محكمة الاغلاق لاتسمح للضوء بالمرور الا من فتحة واحدة هى العدسة المركب عليها " غالق " لا يفتح الا عند لحظة التصوير لنقل الصورة المشاهدة من " عدسة أخرى عينية منفصلة عن غرفة الكاميرا المظلمة " • وأبسط أنواع الكاميرات حتى أعقدها بعد تصنيع الكاميرات الملحق بها أجهزة الكترونية كلها تشترك فى الفكرة الاساسية الواحدة للكاميرا من وجود غرفة مظلمة وعدسة مسجلة ، عدسة لتحديد المنظر المطلوب تصويره •

وأبسط أنواع الكاميرات هى الكاميرا ذات الثقب وهى عبارة عن علبة على شكل مستطيل تتناسب مع نوع الفيلم المستخدم مبطنة بالداخل ببطانة سوداء • يوجد فى مقدمة السند وفى ثقب بابرة فى الخلف فتحة يركب عليها فتحة مساحتها ٣٥مم تساوى مساحة لقطة واحدة من الفيلم ٣٥مم ومركب عليها قطعة ورق مصنفر أو زجاج مصنفر لضبط الصورة ثم غطاء يثبت به القطعة التى ستركب به قطعة الفيلم ويمكن تصنيعها بنفسك وتجربة ذلك مع تركيب قطعة الفيلم فى مكان مظلم •


اقطع فجوة مربعة في أحد جانبي العلبة وسوّد العلبة من الداخل .
الصق الرقيقة المعدنية واثقبها ثم ضع الغطاء في مكانه .
الكاميرات ذات الثقب
صورة مقلوبة وواضحة المعالم
تكون الصورة في الكاميرا ذات الثقب
صورة غير واضحة المعالم
هكذا تبدو الصورة في الكاميرا ذات الثقب الواسع

أنـــــواع الكاميرات :

١ــ حســـب مقاس الفيلم المستخدم :

٣٥ مم ، ١١٠ مم ، ٦ × ٦ ســم .

٢ ــ حســب نوعية العدســـة وطريقة ضبط المسافـة : FOCUS

SLR Single lens reflex

TLR Twiss lens reflex

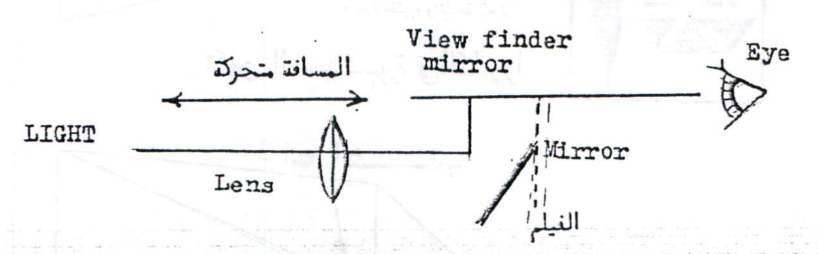
FLR Fixed lens reflex

من النوعيات المستخدمـة فى التصوير العلمـى هو :

٣٥ مم النوع S L R

وهى تقوم باستيعاب فيلم مقاس ٣٥ مم (٢٤ × ٣٦ مم) وطريقة ضبط الصورة SLR

ماهو معنى : S L R



يقع الفيلم فى هذه الكاميرا خلف مرآة متحركـة مع غالق . SHUTTER......
وتضبط المسافة عن طريق تحريك العدسة الى الأمام والخلف حتى تصبح الصورة داخل
View Finder......... واضحـة تماما وفى هذه الحالة تكون الصورة الواقعـة
على الفيلم عند فتح الغالق SHUTTER.... مضبوطـة وواضحـة تماما .
ويمكن تحديد مساحة الصورة المطلوبة عن طريق (View Finder.......) وهى
وهى التى يمكن نقلها على الفيلم وتعادل ٩٥٪ من المنظر المشاهد من عدسة الكاميرا .

ففى هذا النوع من الكاميرات يمكن فك وتركيب العدسـة دون تعرض الفيلم الى التلف حيث يقوم الغالق بحماية الفيلم عند فك العدسـة وبالتالى يمكن تغيير العدسات دون الرجوع الى الحجرة المظلمة أو رفع الفيلم من الكاميرا .

أنواع عدسات الكاميرا العاكسـة : TYPES OF RELEX CAMERA LENSES

Wide angle 50 - 7.5 mm

MACRO Normal 50 mm

Telefoto 50 - 1500 mm

البعد البوءرى للعدسـة ويسمى (FOCAL LENGTH) :

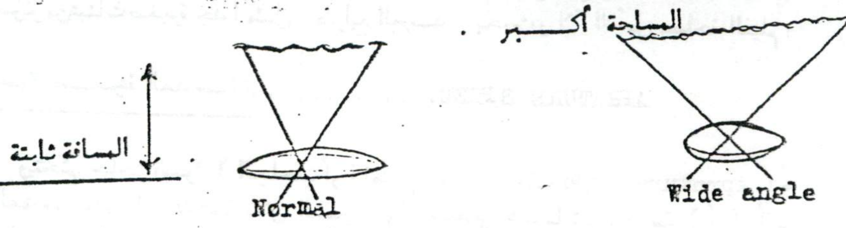
١ـ العدسـة : NORMAL LENS

تم الاصطلاح والتعارف على أن تكون العدسـة ذات البعد البوءرى (٥٠مم) هى العدسـة الطبيعية Normal lens وتستخدم فى التصوير العادى ومعظم أنواع التصوير الصحفى .

٢ـ العدسـة : WIDE ANGLE LENS

وهى عدسـة لها خاصية الزاوية العريضة Wide angle.........

وهى كل عدسـة لها زاوية تسـتطيع أن تلتقط المناظر الموجودة داخل هذه الزاوية على مسافة محدودة .



وكلما قل البعد البوءرى للكاميرا كلما استطاعت أن تصور مساحة أكبر (زادت زاوية التصوير) مع تثبيت المسافة ، وهذه الخاصية تعطى الفرصة لتصوير مناطق أكبر على مساحة صغيرة .

٣ـ العدسات TELOFOTO LENS

وهى تعطى خاصية تقريب المسافات البعيدة مثل الجبال ، ولاعب الكرة ...
ولكن على حساب زاوية التصوير ، فكلما زاد البعد البؤرى للعدسة (
أصبحت ذات زاوية تصوير صغيرة ، ولكن مع ميزة التصوير القريب .

٤ـ العدسات : MACRO LENS

وهى صفة يمكن أن تتوافر فى جميع أنواع العدسات سالفة الذكر ، وعن
طريقها يمكن التصوير من مسافة قصيرة ، حيث أن كل كاميرا لها حد لا يمكن أن تقوم
بالتصوير أقرب منه ، فمثلا العدسة ذات البعد البؤرى ٥٠ مم يكون أقرب مسافة
بين الصورة والعدسة حوالى ٥٠ سم وإذا أردنا أن نصور على مسافة أقل لابد أن تكون
العدسة مجهزة بنظام MACRO وعن طريقه يمكن التصوير حتى مسافة ٥ سم .
ويمكن الاستعاضة عن العدسات ال ...MACRO بعدسات أخرى .

أـ العدسة المقربة : ....CLOSE UP LENS

وهى عدسة تركب أمام العدسة الرئيسية وتقوم بتغيير البعد البؤرى للعدسة
بحيث يمكن أن يكون التصوير من مسافة قريبة .

ب ـ CONVERTER TUBES وهى أنواع من الوصلات مجهزة بنظام
وتوضع بين الكاميرا والعدسة .

جـ ـ BELLOWS وهو يبعد المسافة بين العدسة والكاميرا وبالتالى
تكتسب خاصية التصوير القريب
Close up photography or Macrophotography

ويمكن أن تكون ....CONVERTER or BELLOWS
لها مقاسات مختلفة بحيث تكون النسبة بين الصورة المراد تصويرها والصورة على الفيلم
بنسبة ١ : ١ أو ١ : ٢ أو ١ : ٣ وهكذا . وعن طريق هذه العدسات
يمكن التصوير من عينات صغيرة جدا مثل طوابع البريد بحيث تملأ الأشمل مساحة الفيلم .

حاجب الضوء وسرعة العدسة : ....APRATURE SPEED

ويتحكم حاجز الضوء (الحاجب أو المنظم ......Aprature speed) ،
فى سرعة العدسة وهى أكبر فتحة يمكن التصوير بها ، بمعنى عندما تكون عدسة (أ) أكبر
فتحة لها هى ١ر٧ ، وعدسة (ب) أكبر فتحة لها ٥ر٣ تكون العدسة أ أسرع من ب .

وكلما زادت سرعة العدسة ،كلما زادت قدرتها على نقل الصورة كما هي بكل تفاصيلها ، ومن المعروف عن عدسة الانسان أن سرعتها ٥ر٠ ، وهناك محاولات للوصول الى هذه السرعة وبالتالى تكون قدرتها على رؤية التفاصيل كعين الانسان .

وأكبر فتحة للتصوير تكون عندما يكون الغالق مفتوحا على آخره

الغالق ← العدسة ١٫٧ ، ١٫٤ أكبر فتحة الرقم صغير وهى تمثل ١ / نصف قطر العدسة

الغالق ← العدسة أقل فتحة الرقم كبير ١٦ ، ٢٢ ، ٣٢

والحاجب (الغالق الضوئى) يتحكم فى كمية الاضاءة الداخلة الى الكاميرا ، فعندما تكون العدسة والحاجب مفتوحا على آخره (فتحة مثلا ٢ر١) تكون كمية الاضاءة أقصى مايمكن (أقصى ماتستطيع أن تدخله العدسة) وعندما يكون الغالق مقفول (١٦ أو ٢٢ ، أو ٣٢) تكون كمية الاضاءة أقل مايمكن .

تغيير فتحة الغالق : D. F. (DEPTH FIELD)

تؤثر فتحة الغالق على عمق الميدان وهى المسافة المحصورة بين الفيلم والصورة وتتأثر بالعوامل التالية :

١ـ ١ـ فتحة العدسة : Aprature speed

كلما زادت فتحة العدسة كلما قل عمق المجال D.F.

٢ـ المسافة بين العدسة والصورة :

كلما زادت المسافة بين الصورة والعدسة كلما زادت D.F.

٣ـ نوعية العدسة :

كلما كانت ذات بعد بؤرى كبير.......FOCAL LENGTH كلما قل

* * أهمية : ....Depth Field

أولا : يمكن عن طريقه الغاء بعض التفاصيل فى الصورة فعندما يكون الـ D. F. فى حدود (١ـ ٢ متر) وتحاول تصوير صديق ، وخلف الصديق على بعد ٣ متر مناظر غير مرغوبة فاننا نقوم بالآتى :

١ـ زيادة فتحة العدسة ٠

٢ـ ضبط سرعة الكاميرا (Shutter speed of the camera) حتى يمكن ضبط كمية الضوء الداخلة الى الكاميرا ٠

٣ـ تقريب الكاميرا بين العديق بتقليل المسافة بين العدسة والصديق٠

ثانيا : يمكن عن طريق D. F. تصوير مناظر مجسمة مثل كورة ، مكعب بحيث يكون كل حدوده واضحة تماما (IN- FOCUS) وفى هذه الحالة نقوم بالتالى :

١ـ تقليل فتحة العدسة ٠

٢ـ ضبط سرعة الكاميرا وبالتالى كمية الاضاءة ٠

٣ـ التصوير من مسافة بعيدة بقدر الامكان أو استخدام عدسات خاصة لها خاصية الـتقريب MACRO .

ويدور السؤال ، هل هناك أهمية لـ D.F. فى حالات نقل الصور ...لا ... لأن الصور غير مجسمة وليس لها عمق مجال (D.F.) وبالتالى يمكن فتح العدسة على الاخر واستخدام سرعة عالية بحيث لاتهتز الكاميرا أو الصورة ٠

الطريقة المثلى لنقل الصور أو الشرائح SLIDES

أولا : وضع الكاميرا والأصل على حامل خاص ....Copy Stand

ثانيا : فتح العدسة على ٤ ، ٥ر٦ ٠

ثالثا : جعل السرعة (٦٠ أو ٣٠ أو يمكن استخدام ١٢٥ اذا كانت الاضاءة شديدة) ٠

رابعا : استخدام وصلة للضغط على الغالق ....Release لمنع الاهتزاز٠

خامسا : ضبط الاضاءة عن طريق :

١ـ استخدام ضوء الشمس اذا كان ذلك ممكنا ٠

٢ـ استخدام ضوء التنجستين Tungesten + فلاتر التعديل ٠ مثل 80 A , 80 B وهو مرشح (فلتر) لونه أزرق ٠

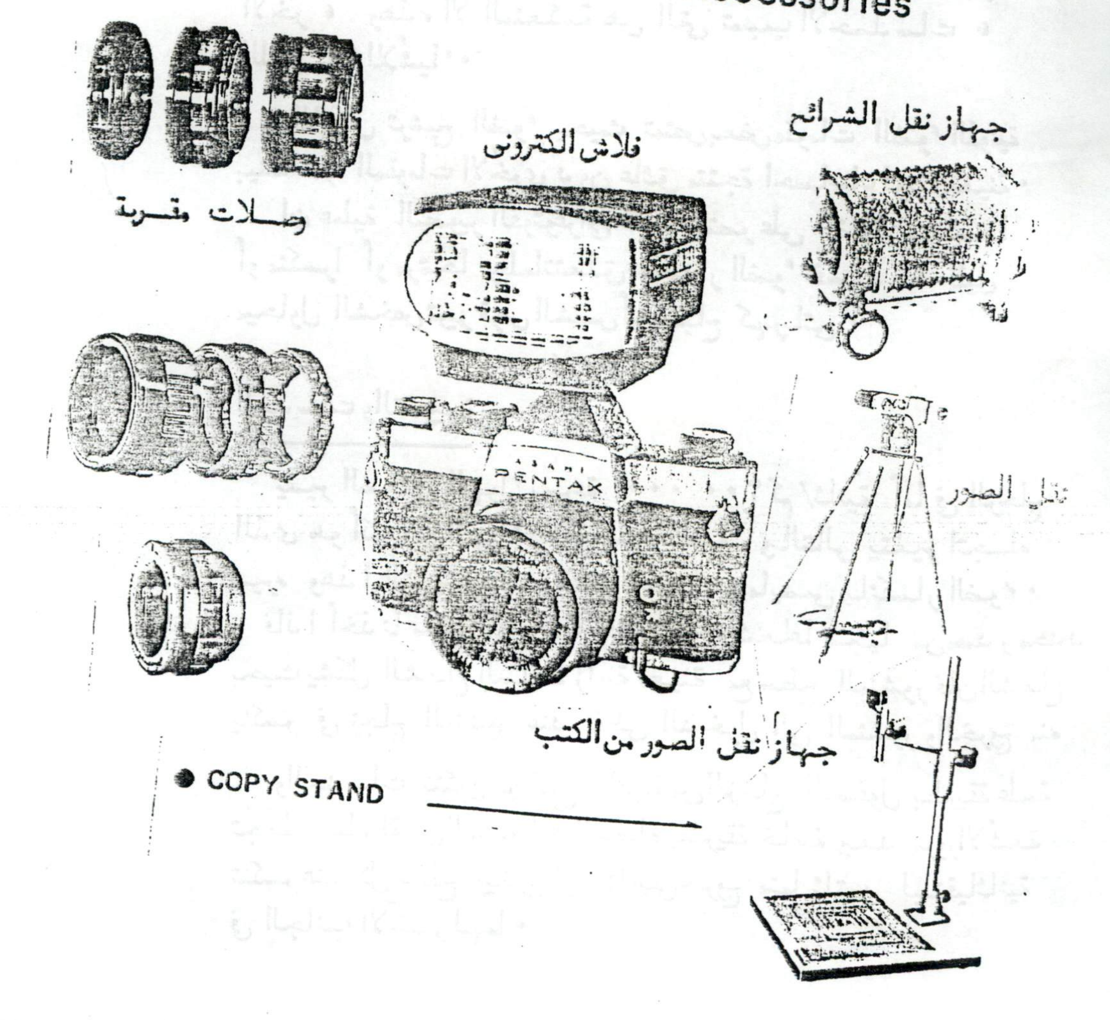
٣ـ استخدام أنواع من الأفلام الخاصة Tungesten وهى أفلام معاملة بحيث يمكن التصوير عليها باستخدام الاضاءة العادية ٠

ZOOM LENSES العدسات زووم

هى عدسات ذات بعد بوئرى متغير بحيث يمكن التحكم فى البعد البوئرى فمثلا اذا كانت هناك عدسة زووم ZOOM ذات بعد بوئرى (٢٨ ـ ٨٥ م) تكون هذه العدسة لها خاصة Wide angle من ٢٨ ـ ٥٠ م وخاصة TELEFOTO من ٥٠ ـ ٨٥م وتلاحظ أن زاوية التصوير متغيرة من ٢٨ ـ ٨٥ م وكلما زاد البعد البوئرى قلت زاوية التصوير وزادت تكبير الصورة (الصورة أصبحت قريبة) .

بعض الاضافات الضرورية للكاميرا رفلكس

Macrophotography, Photomicrography, and other Miscellaneous Accessories



طريقة تكوين الصورة على الفيلم :

تمر الأشعة المنعكسة من الضوء الساقط على المنظر من خلال عدسة الكاميرا وتسجل على الفيلم خلال وقت التعريض الذي يفتح فيه الغالق بعد ضبط الوضوح للصورة .

الضوء والتصوير :

ان الضوء الساقط على أى جسم ينعكس فى صورة أشعة مستقيمة والأجسام الملونة تمتص جزء من هذه الأشعة الملونة وتعكس الجزء الاخر ، وهذه الأ المنعكسة هى التى تسبب الاحساسات ، اللونية للأشياء .

وبالامكان ترشيح الضوء بحيث تمتص بعض مقومات الضوء اللونية بينما تمر المقومات الاخرى دون عائق منتجة احساسات لونية معينة .
ان عملية التصوير الفوتوغرافى تكاد تقتصر على الضوء منعكسا أو منكسرا أو مرشحا وقلماتتعلق بمصدر الضوء نفسه ، فقليل ميحاول الشخص تصوير قرص الشمس أو مصباح كهربائى .

العدسات والتصوير :

يسير الضوء فى الهواء بسرعة ٣٠٠٠٠٠ كم /ثانية أما فى الزجاج الذى هو أكثف من الهواء فتقل سرعة الضوء وبالتالى يتغير اتجاه سيره وهذا التغير فى اتجاه سير الضوء هو مايسمى بانكسار الضوء .
فاذا أخذنا منشورا زجاجيا وأمررنا عبره شعاعا ضوئيا من مصدر محدد بحيث يشكل الشعاع الساقط زاوية معينة مع سطح المنشور فان الشعاع ينكسر فى زجاج المنشور عند نقطتى الدخول الى المنشور والخروج منه

والعدسات تتكون من قطع دائرية من الزجاج المصقول بطريقة علمية تجعله سلسلة من المنشورات المتصلة بطريقة خاصة وبعد مرور الأشعة تنكسر عند كل سطح ويخرجان بزاويتى خروج متماثلتين ليلتقيا ثانية فى الجانب الاخر لهما .

مرور الضوء فى العدسات:

تعمل العدسة فى مقدمة الكاميرا على ادخال كمية أكبر من الضوء واذا ماثبت الفيلم فى البقعة التى تتلاقى فيها أشعة الضوء بعد عبور العدسة فاننا نحصل على صورة محددة المعالم . والمسافة بين العدسة ونقطة تلاقى الأشعة الضوئية الواردة من جسم بعيد تعرف " بالبعد البؤرى " للعدسة . أما نقطة تلاقى الأشعة نقطة البؤرة . وتستقل العدسات للحصول على البعد البؤرى المعين ويظل هذا البعد ثابت لايمكن تغييره فيمابعد ، فلكى تلتقى الأشعة الداخلة عبر العدسة على الفيلم لابد لها من السقوط بزاوية معينة على العدسة ،وهذه الزاوية يحددها بعد العدسة عن الجسم أو المنظر المراد تصويره تنبعث الأشعة من كل نقطة من الجسم وبعد عبور العدسة تتجمع الأشعة على الفيلم متلامسة بشكل مخروطى فاذا كان الجسم على البعد الصحيح فان الأشعة تتجمع فى نقطة البؤرة حيث يوجد الفيلم مكونة صورة واضحة محددة المعالم ،أما اذا كان الجسم أقرب مما يجب أو بعيد جدا فان الأشعة ستلتقى فى نقطة أمام أو خلف الفيلم مما يكون صورة مغبشة " مهزوزة " .

الوضوح والرقم البؤرى :

الكاميرات البسيطة تزود بعدسات ثابة محددة البعد البؤرى . أما الكاميرات الحديثة فلها عدسة متحركة لتغيير المسافة بين العدسة والفيلم بطريقة محوية تتحرك العدسة على مجرى مسنن .

بالاضافة الى البعد البؤرى المحدد للعدسة تعطى رقما هو رقمها البؤرى ، ويوضح هذا الرقم العلاقة بين فتحة العدسة ، وبعدها البؤرى .

$$\text{الرقم البؤرى} = \frac{\text{البعد البؤرى}}{\text{قطر فتحة العدسة}}$$

أى أنه اذا قل الرقم البؤرى فان فتحة العدسة تزداد اتساعا . فالرقم البؤرى ف ٨ر٢ (   ) هو أكبر من الرقم ف ٦ر٥ وفى الكاميرات يمكن ضبط الرقم البؤرى بواسطة فتحة حجاب قرحى اذ تضيق عند شدة الشمس وتوسع فى وجود ضباب .

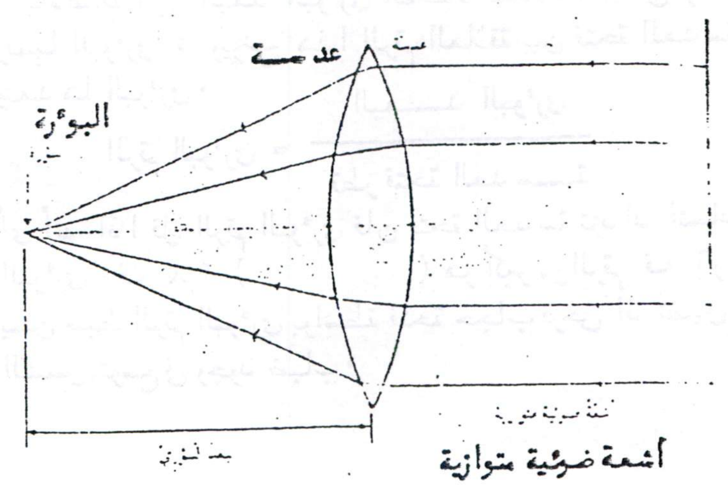
موشوران منطبقا القاعدتين

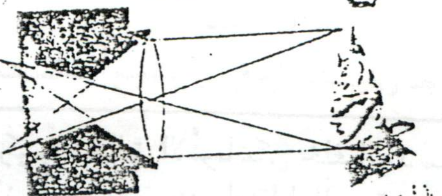
منشوران متطابقا القاعدة

يمكن اعتبار العدسة المحدبة سلسلة متصلة من الموشورات الصغيرة

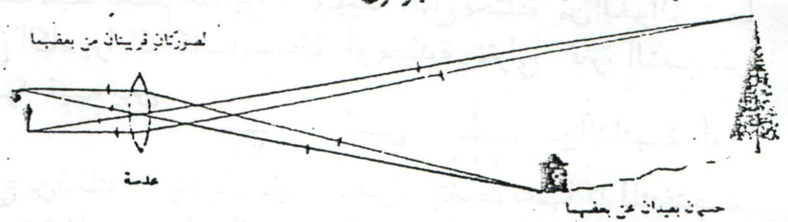
البقعة الناتجة من الضوء المسلط بالعدسة المحرقة هي الصورة المصغرة للشمس .

مرور الأشعة من العدسة لتكوين بقعة مضيئة



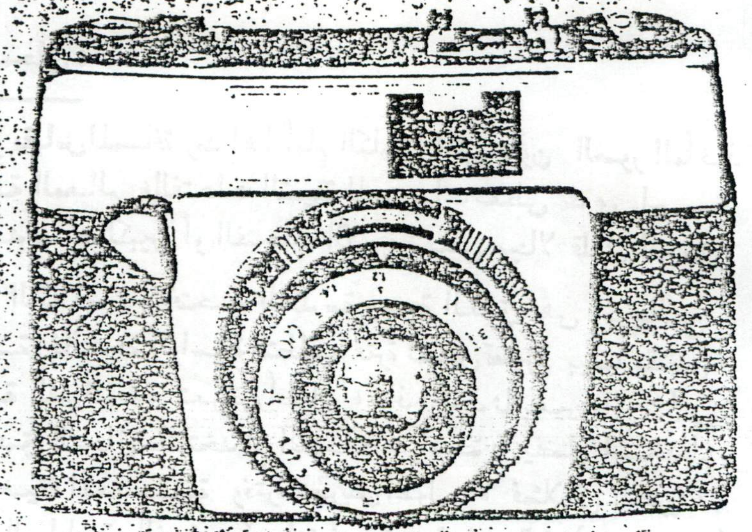


الجسم على بعد صحيح (مضبوطة التركيز البؤري)

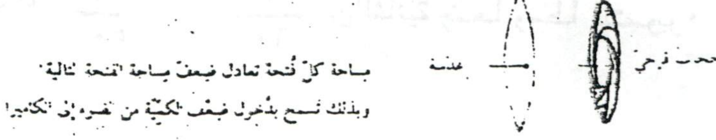


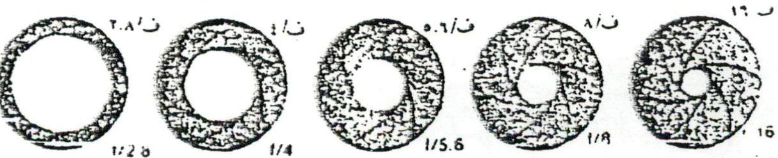
الجسم غير مضبوط البعد البؤري

يمكن للعدسة ذات البعد البؤري الصغير الثابت أن تكون صوراً واضحة على مدى شاسع



كاميرا معتدلة الثمن ذات عدسة تركيز بؤري





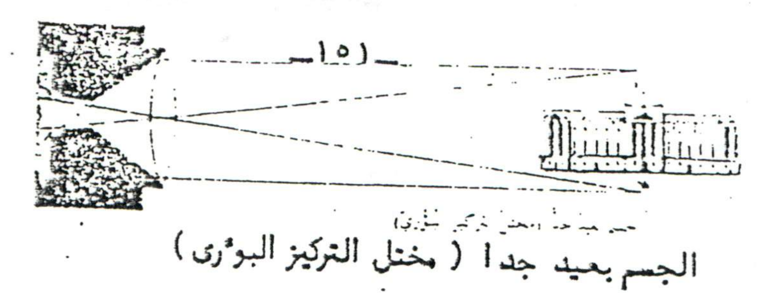
غلق العدسات أوتوماتيكيا وفترة التعريض للضوء :

يتم تركيب الغالق الأتوماتيكي خلف العدسة حيث يفتح ليعرض الفيلم للضوء المعكوس عند التقاط الصورة ، ويشغل الغالق بواسطة ضاغط مثبت بجسم الكاميرا ، وتوجد أنواع مختلفة من الغوالق تبعا لنوع الكاميرا اذا كانت بسيطة أو معقدة وتتراوح فترة التعريض للضوء فيه بين $\frac{١}{٣٠}$ الى $\frac{١}{٣٠٠}$ من الثانية أو أسرع من ذلك ، وتضبط سرعة التعريض وتضبط معها كذلك فتحة العدسة للحصول على التعريض الصحيح الذى يلائم ظروف الاضاءة حيث تجرى عملية التصوير .

عمق المجال :

هو مقياس للمسافة ومداها أمام الكاميرا التى تكون الصور المأخوذة واضحة المعالم ، الفتحات الضيقة للعدسات تعطى مدى واسع أما العدسات الكبيرة أو الفتحات الكبيرة تعطى مجالا قليل العمق .

ان العلاقة بين فتحة العدسة وسرعة الغلق هى أمر بالغ الأهمية فالفتحة الواسعة تتطلب فترة تعرض قصيرة بينما تقتضى الفتحة الضيقة فترة تعريض أطول ، فاذا أخذنا بعين الاعتبار قيود عمق المجال باستخدام الفتحات الواسعة ، يفضل استخدام فتحة ضيقة للعدسة وفترة تعريض أطول ، فمثلا فى الظروف الجوية الساطعة الضوء يمكن اعتبار فتحة ف ١٦ ( ) وفترة تعريض $\frac{١}{٥٠}$ أو $\frac{١}{٦٠}$ من الثانية وضعا وسطا للتصوير .



الجسم بعيد جداً (مختل التركيز البؤرى)

عمق الميدان (المجال)

دائرة الاختلاط (الزوغان) واسعة – البرج خارج المجال البؤري

فتحة العدسة واسعة – مجال قليل العمق

دائرة الاختلاط ضيقة – البرج ضمن المجال البؤري

فتحة العدسة ضيقة – مجال عميق المدى

مضابط الكاميرا

عند ضبط الفتحة على ف/١١ (f/11) وتركيز البعد البؤري على ٥ أمتار

عمق المجال هو بين ٣ و ١٠ أمتار

حلقة التركيز البؤري

يضبط فتحة العدسة

مقياس عمق المجال

يضبط سرعة الغلق

2.5 3 5 10 ∞

15 30 ft

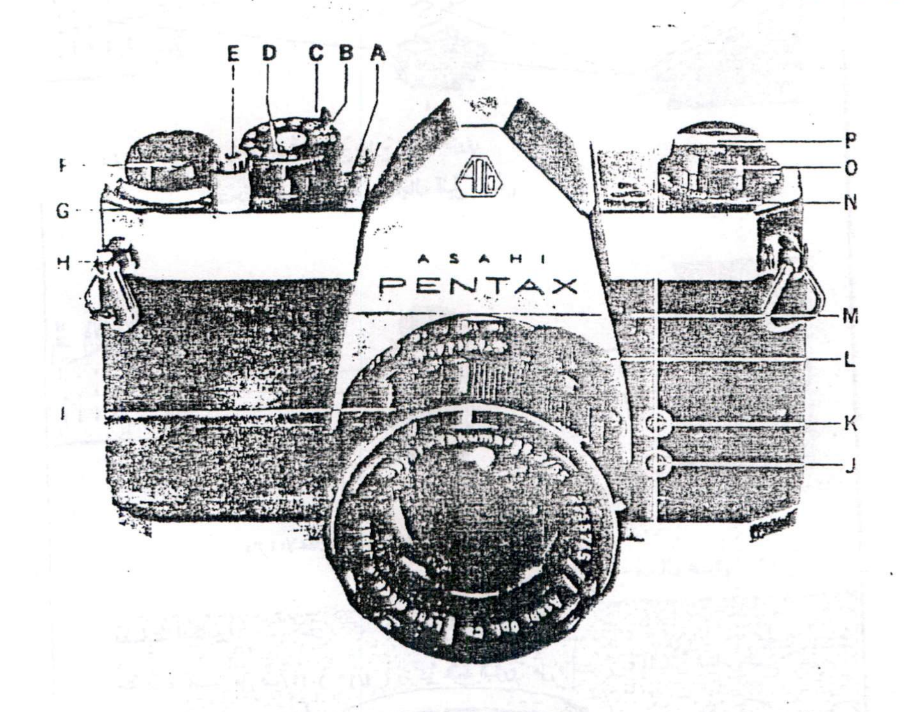
8 5.6 4 2.8 4 5.6 8 11

22 16 11 8 5.6

300 125 60 30

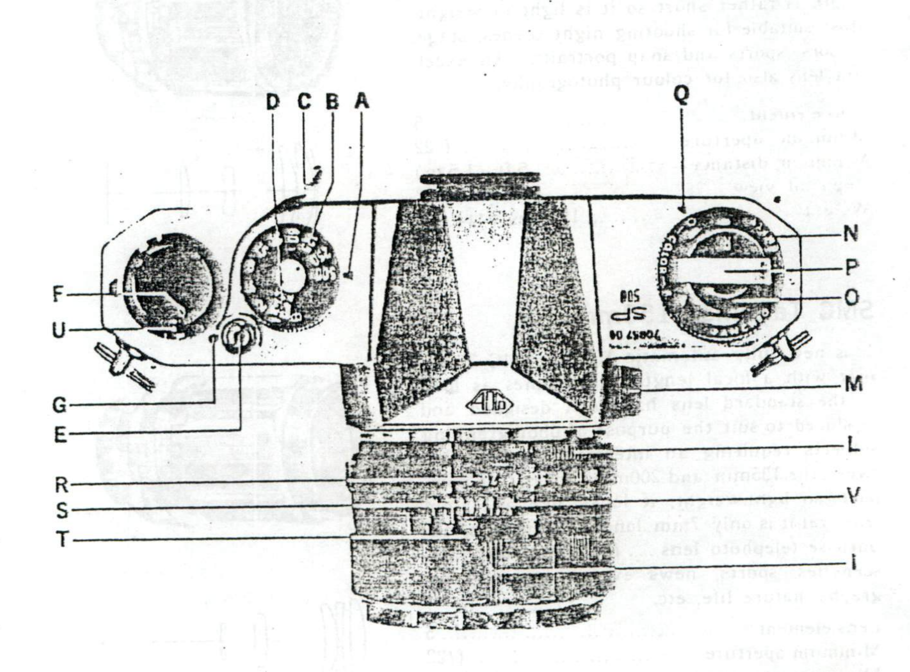
الشكل الخارجى وأجزاء الكاميرا رفلكس

Major working parts of the ASAHI PENTAX SP 500



A – Shutter speed index
B – Shutter speed dial
C – Rapid wind lever
D – ASA film speed setting
E – Shutter release

F – Automatic reset exposure counter
G – 'Cocked' indicator
H – D-ring lug
I – Focusing ring
J – X flash terminal



K – FP flash terminal

L – Preview lever

M – Exposure meter switch

N – Film type reminder dial

O – Rewind knob

P – Rewind crank

Q – Film type index

R – Diaphragm ring

S – Diaphragm and distance index

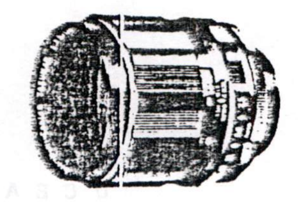
T – Distance scale

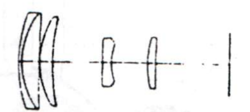
U – Exposure counter index

V – Depth-of-field guide

SMC Takumar 135mm f/2.5

A faster f/2.5 lens has joined the superb Takumar 135mm lens family. Well balanced, its total length is rather short so it is light in weight. Most suitable for shooting night scenes, stage, indoors, sports and snap portraits. An excellent lens also for colour photography.

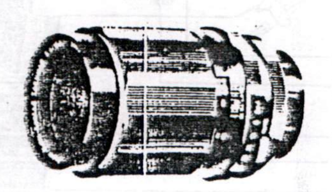


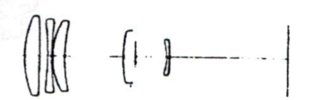


Lens element	5
Minimum aperture	f 22
Minimum distance	5 ft. (1.5 m)
Angle of view	18°
Weight	15.5 ozs. (444 gr.)

SMC Takumar 150mm f/4

This new fully automatic 150mm SMC Takumar with a focal length three times as long as the standard lens has been designed and produced to suit the purpose of photographing subjects requiring an intermediate angle between the 135mm and 200mm lenses. So compact so light-weight, it looks like a 135mm lens yet it is only 7mm longer. New-type, all-purpose telephoto lens ... for telephoto snaps, sceneries, sports, news events, stage photographs nature life, etc.

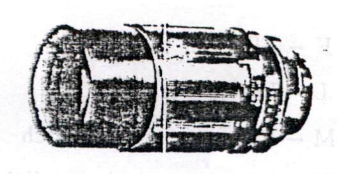


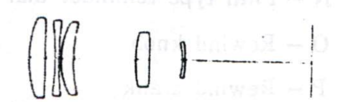


Lens element	5
Minimum aperture	f/22
Minimum distance	6 ft. (1.8 m)
Angle of view	16.5°
Weight	11.3 ozs. (324 gr.)

SMC Takumar 200mm f/4

A new member to the superb Takumar telephoto lens family. Equipped with a fully automatic diaphragm. Compact, light, and elegantly designed for fast handleability.

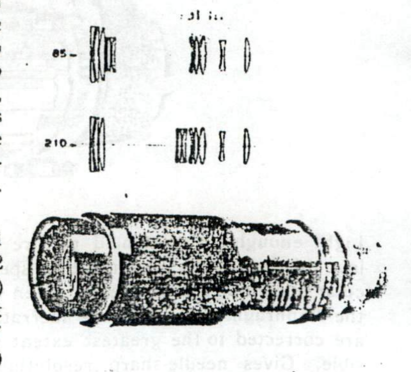




Lens element	5
Minimum aperture	f/22
Minimum distance	8.2 ft. (2.5m)
Angle of view	12.5°
Weight	19.3 ozs. (550 gr.)

SMC Takumar-Zoom 85mm ~ 210mm f/4.5

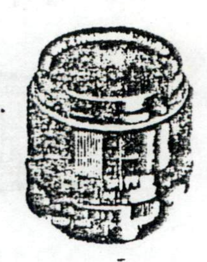
With the new SMC Takumar-Zoom 85 ~ 210mm f/4.5, zooming and focusing are done in one action. So you get the kind of speed that's so essential to zoom shooting. With a zoom ratio of 2.5 and focal calibrations of 85, 100, 120, 135, 150, 180, 210, and any point within this range, this one lens takes the place of the most frequently used group of interchangeable lenses. It's compact and lightweight, too. Truly the most versatile lens you can own.



Lens element 11
Minimum aperture f/22
Minimum distance................. 11.5 ft. (3.5m)
6.24 ft. (1.9m) with attachment
Angle of view .... 28° 5′ ~ 11° 5′
Weight .... 24.86 ozs. (705 gr.)

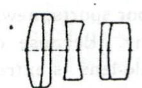
SMC Macro-Takumar 50mm f/4

The new SMC Macro-Takumar 50mm f/4 lens is equipped with a fully automatic diaphragm to further increase its high performance. The magnification range is from 1/2 to infinity, but by applying the Auto Extension Tubes, you can shoot from life size to infinity. The automatic diaphragm enables you to shoot such difficult subjects as moving insects, while holding your camera and looking through the viewfinder.



Lens element 4
Minimum aperture.. .... f/22
Minimum distance .... 0.77 ft. (0.234 m)
Angle of view.. 46°
Weight .... 8.74 ozs. (248 gr.)

SMC Bellows-Takumar 100mm f/4

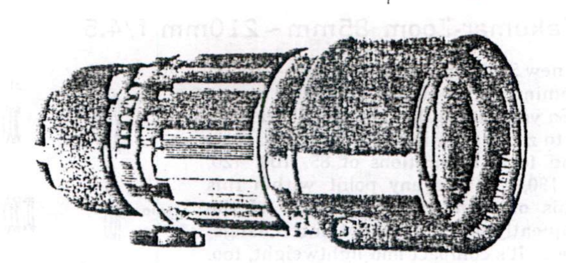


Used with the standard Bellows Unit, this short-barrel lens enables you to photograph from life size to infinity. Extremely convenient for close-ups from a distance.



Lens element 5
Minimum aperture f/22
Angle of view.. 24°
Weight .... 4.9 ozs. (139 gr.)

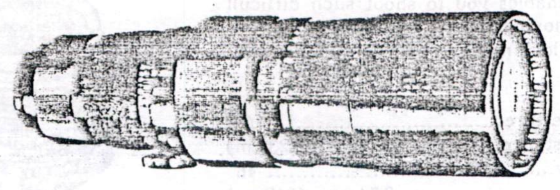
Super-Takumar 300mm f/4



Light enough for hand-held picture taking, this lens is the most ideal for spectacular telephotographic effects. Even with the diaphragm fully open, the aberrations are corrected to the greatest extent possible. Gives needle-sharp resolution to every corner of the picture. Equipped with fully automatic diaphragm; supplied with special lenshood.

Lens element 5
Minimum aperture f/22
Minimum distance .... 18 ft. (5.5m)
Angle of view .... 8°
Weight .... 33.1 ozs. (946 gr.)

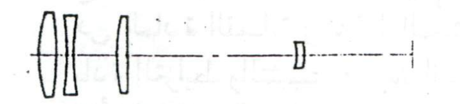
SMC Takumar 400mm f/5.6

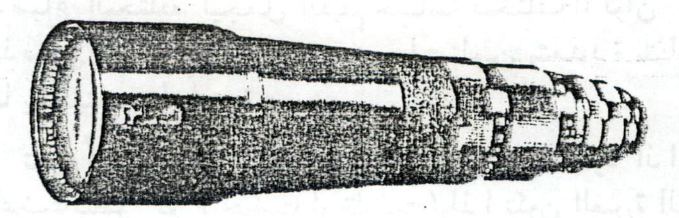


Especially designed for those professionals who specialize in outdoor sports, news and nature-life photography. Because of its f/5.6 aperture, this tele-lens is extremely compact and light for its focal length of 400mm. Also because of its portability, it can be easily hand-held for fast and successive shooting, depending upon the shutter speed to be used. Equipped with click-stop manual diaphragm; supplied with special lenshood.

Lens element 5
Minimum aperture f/45
Minimum distance .... 27 ft. (8 m)
Angle of view .... 6°
Weight .... 45 ozs. (1300 gr.)

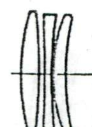
SMC Takumar 500mm f/4.5



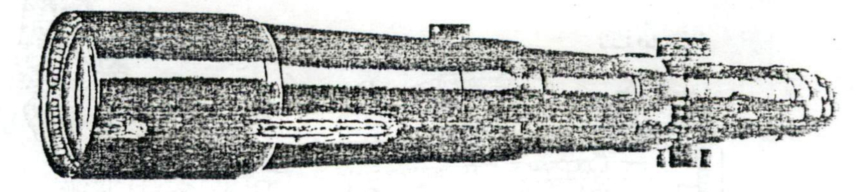


Comparatively light and small for its performance, this powerful long-focus lens brings the inaccessible within reach. Its bright f/4.5 image simplifies composition and focusing, and it produces edge-to-edge coverage of high resolution. Equipped with manual diaphragm; supplied with special lenshood.

Lens element 4
Minimum aperture f/45
Minimum distance .... 32.8 ft. (10 m)
Angle of view .... 5°
Weight .... 122.5 ozs. (3500 gr.)



SMC Takumar 1000mm f/8



Photographs subjects which are too far away to be seen by the naked eye. The ultimate in fine optics for the photographer who specializes in news, sports, scientific or wildlife photography. Fast, accurate focusing with manual diaphragm. Furnished with built-on lenshood, rigid wooden tripod and in wooden cases.

Lens element 5
Minimum aperture f/45
Minimum distance .... 98 ft. (30 m)
Angle of view .... 2.5°
Weight of lens .... 192.5 ozs. (5.5 kg.)
Weight of tripod .... 26 lbs. (11.8 kg.)

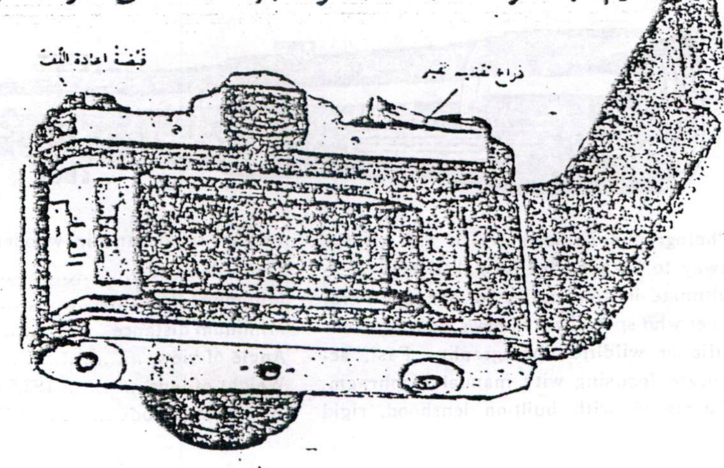
الفيلم والتركيب الكيميائى :

الصور الفوتوغرافية بالأسود والأبيض هى انطباع كيماوى على أملاح الفضــة ويتألف الفيلم من نسيج من السليلوز الشفــاف مغطى بمستحلب من أملاح الفضــة على شكل بللورات دقيقة مع الجيلاتين لتكوين طبقة الفيلم الحساسة • ان أملاح الفضة هى المادة الفعالة فى هذا المستحلب بينما يشكل الجيلاتــين مادة الترابط والتثبيت • ويضاف الى المستحلب عدد كبير من الأصباغ المختلفة ليجعل الفيلم حساسا لمختلف الألوان تظهر هذه على الصــورة النهائيــة بدرجات تلوين متعددة متفاوتة مما يعطينا صورا ملونــة •

تتميز أملاح الفضة بخاصــة فريدة هى أنها تسود اذا ماعرضت للضوء ثم (حمضت أو ظهرت) ولذا تكون الصورة السالبة على الفيلم معكوســة من حيث توزيع مناطق التلوين "أبيضا وأسودا" ومقلوبة من حيث الوضع أيضا •

تعبئة الكاميرا ٣٥ مم بالفيلم :

كما سبق تتضح أهمية الضوء فى التصوير ولذلك يلزم التعامل مع مراحل التصوير بحذر شديد ومعرفة فترات التعريض وفترات حجب الضوء عن الفيلم الخام وأثناء التحميض والطبع ولكل نوع من الأفلام درجة حساسية تبعا للاستجابة لشدة الضوء يشــار اليها باشارات Din أو ASA الأعلى هو الأسرع •



التصوير الميكروسكوبي

تتلخص فكرة التصوير بواسطة الميكروسكوب بتركيب كاميرا من النوع "ريفلكس" ذو المرآة العاكسة على أنبوبة الميكروسكوب ونقل الصورة المعكوسة بواسطة العدسة الشيئية من على الشريحة الى تسجيلها على الفيلم ٣٥ مم .

وحاليا تستخدم ميكروسكوبات التصوير بها نفس الفكرة مثبت عليها كاميرا (شكل) ولها عدسة عينية خاصة بها يمكن للفاحص تسجيل الصور التي يشاهدها من الميكروسكوب على الفيلم المركب بالكاميرا .

خطوات التصوير بالميكروسكوب:

١- تفتح الكاميرا وتعبأ بالفيلم الموجود في علبة (كاسيت) سواء كان ملونا أو أبيض واسود (سالب أو موجب) . وتغلق الكاميرا . وتضبط على السرعة المناسبة لمدة التعريض تبعا لشدة اضاءة الميكروسكوب .

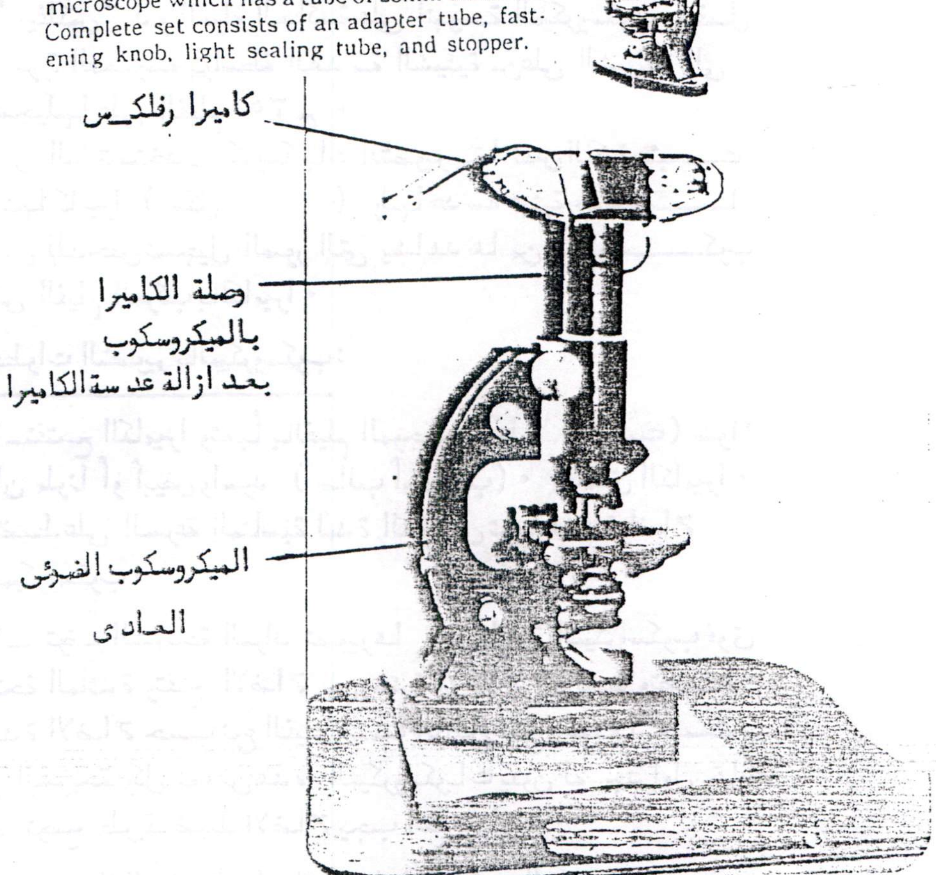
٢- توضع الشريحة المراد تصويرها على مائدة الميكروسكوب فوق فتحة المائدة وتفتح الاضاءة من وحدة الاضاءة المرفقة وتضبط شدة الاضاءة حسب نوع الفيلم وسمك القطاع ونوع الصبغات المستخدمة في الشريحة وكل نوع من هذه الميكروسكوبات يكون له جداول خاصة به توضح طريقة ضبط الاضاءة يجب استخدامها .

٣- تضبط الرؤية بواسطة الضابط الخاص بالميكروسكوب وبعد وضوح الرؤية تنقل الصورة الى أنبوبة الكاميرا بغلق فتحة العدستان العينيتان بواسطة الغالق الجانبي .

٤- ينظر على الشريحة من عدسة الكاميرا العينية لمشاهدة الشريحة وتضبط الصورة بواسطة ضوابط الميكروسكوب حتى نحصل على أحسن وضوح للصورة لتوضيح الجزء المراد توصيله ونقله على الفيلم .

MICROSCOPE ADAPTER

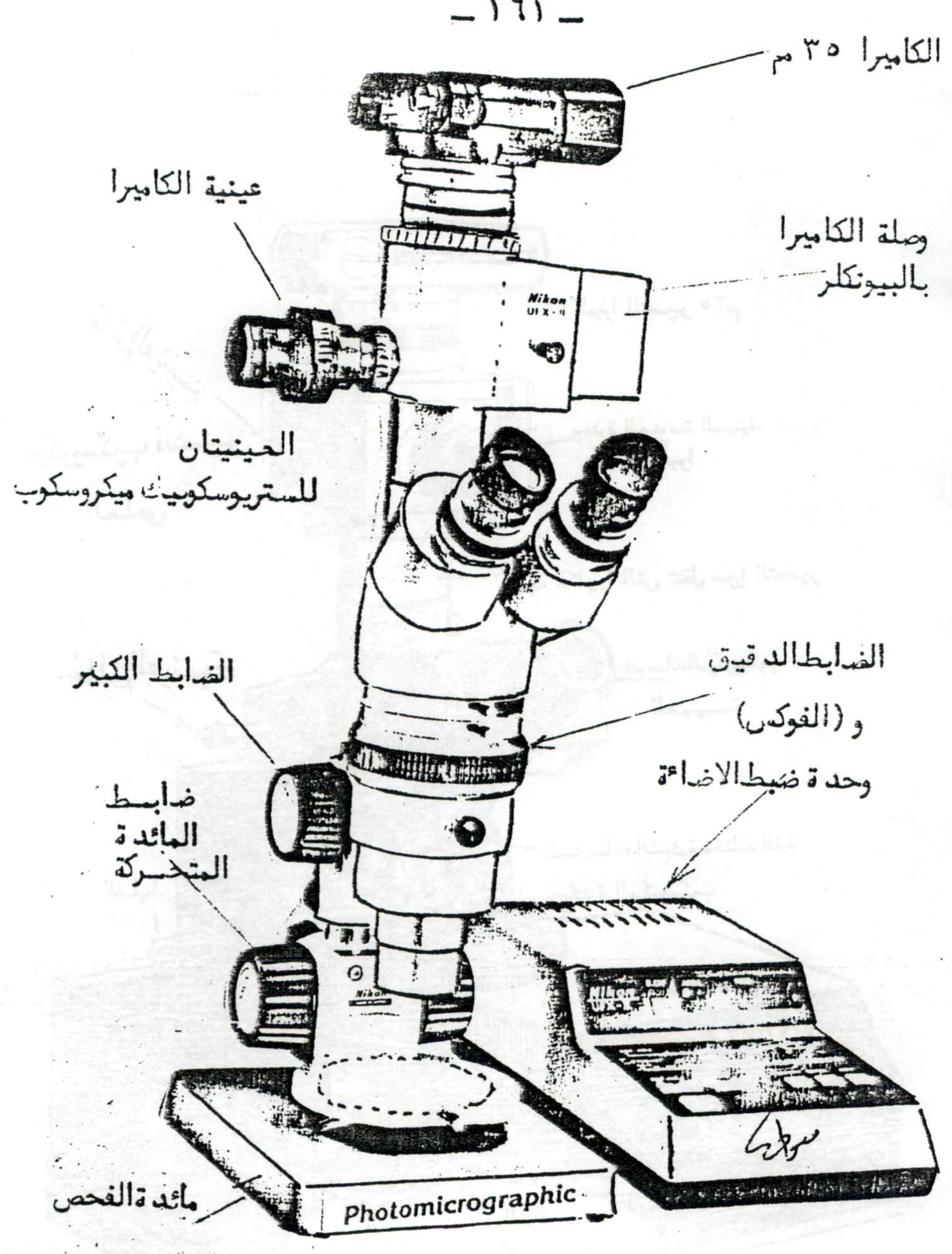
Fitting between the Asahi Pentax camera body and the microscope tube, this adapter permits utilization of the microscope's optics in place of the camera's lens. It may be used with any microscope which has a tube of 25mm diameter. Complete set consists of an adapter tube, fastening knob, light sealing tube, and stopper.



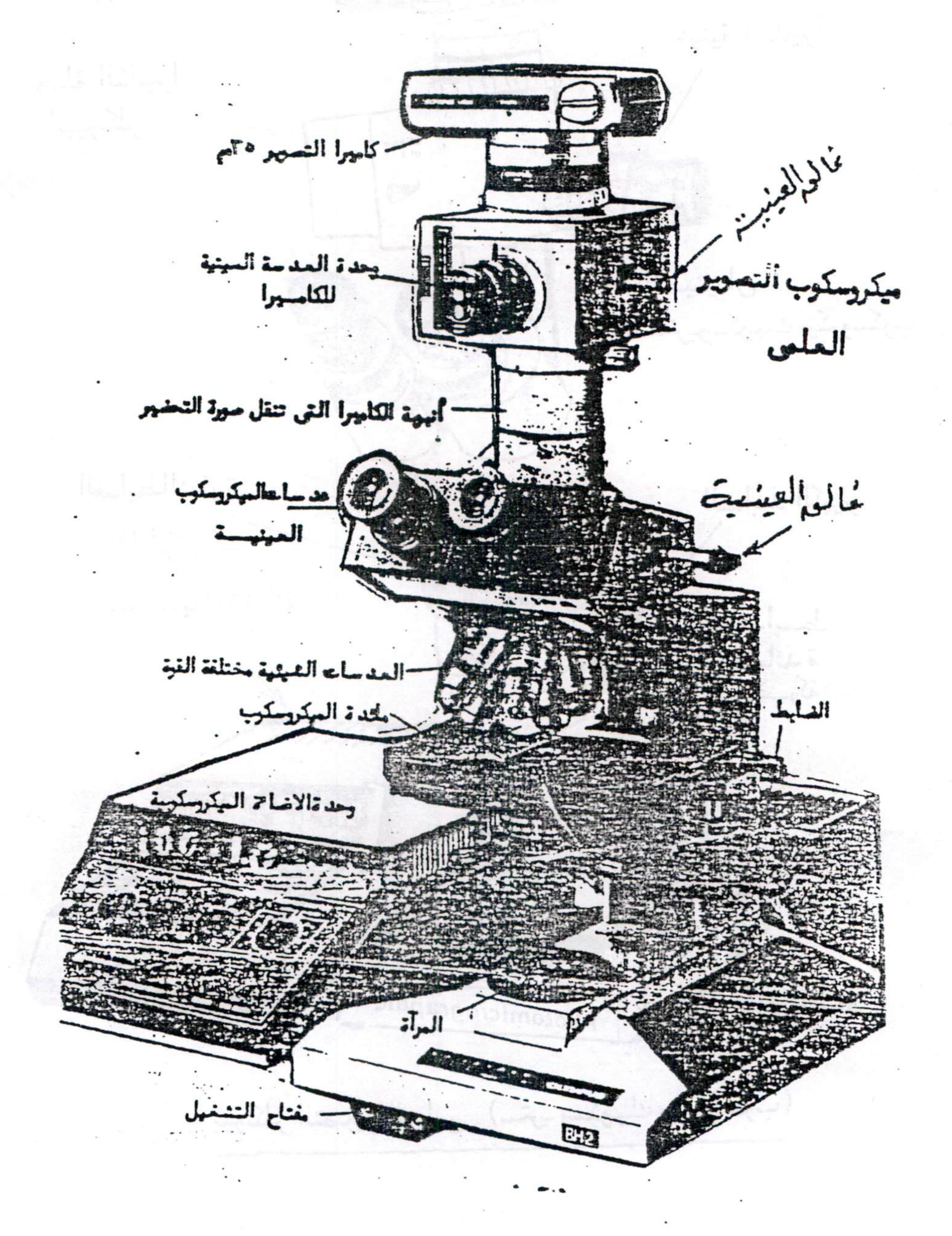
طريقة التصوير من الميكروسكوب الضوئى العادى باستخدام

الكاميرا ذات المرآة العاكسـة

(عن خطاب ١٩٧٦)



بيونكلر التصوير العلمي (ستريوسكوبيك ميكروسكوب)


كاميرا التصوير ٣٥مم
وحدة العدسة السينية للكاميرا
ميكروسكوب التصوير العلمى
أنبوبة الكاميرا التى تنقل صورة التحضير
عدسات الميكروسكوب العينية
العدسات الشيئية مختلفة القوة
منضدة الميكروسكوب
الضابط
وحدة الاضاءة الميكروسكوبية
المرآة
مفتاح التشغيل
BH-2

٥ـ بعد تحديد الجزء على الشريحة المراد تصويرة تغلق عينية الكاميرا بواسطة الغالق الخاص بها وتصبح صورة الشريحة متصلة بغالق الكاميرا ، وبعد تحديد سرعة الكاميرا بضبطها على السرعة المناسبة للتصوير ودائما تستخدم السرعتان ب ، ت ، وطبقا للجداول المرفقة لمدة التعريض ، يضغط على زر الكاميرا لفتح الغالق للمدة المقررة للتعريض ثم يغلق ، وتغير الصورة الى لقطة جديدة وهكذا .

٦ـ بعد انتهاء التصوير للفيلم يسحب بواسطة يد الكاميرا الخاصة بالترجيع الى مكانه بالكاسيت وتفتح وينقل الى معمل التحميض والطبع .

اظهار الفيلم والورق الحساس أبيض وأسود

كل عمليات اخراج الفيلم الملون أو الأبيض والأسود تتم فى غياب الضوء (الاظلام) ويتم تحميض الفيلم السالب أبيض وأسود فى الاظلام التام ويمكن استخدام لون أخضر غامق جانبى فى حجرة الاظلام لاختيار الوقت اللازم للاظهار .

أما فى حالة طبع الورق الاسود والابيض فيتم فى حجرة مظلمة فيها لمبة تعطى ضوء أحمر أو برتقالى لمشاهدة درجة ظهور الصورة على الورق . وكذلك التثبيت فى محاليل التثبيت .

١ـ <u>محلول الاظهار للفيلم السالب والطبع للورق الحساس:</u>

١ـ ميتول ٢ جم   ٢ـ سلفيتصوديوم ٢٥جم

٣ـ كربوناتصوديوم ٣٠ جم   ٤ـ هيدروكينون ٥ جم

٦ـ بروميد البوتاسيوم ١ جم .

تذاب هذه الكيماويات فى لتر ماء مقطـــر وعلى درجة ٢٠ م .

ويمكن اضافة هذه الكيماويات والتخين الهادىء للاذابة ثم التبريد الى ٢٠ م° · وتمرر الأفلام الأبيض والأسود السالبة لمدة ٢ـ ٦ دقائق · حسب شدة الاضاءة ومدة التحريض ·

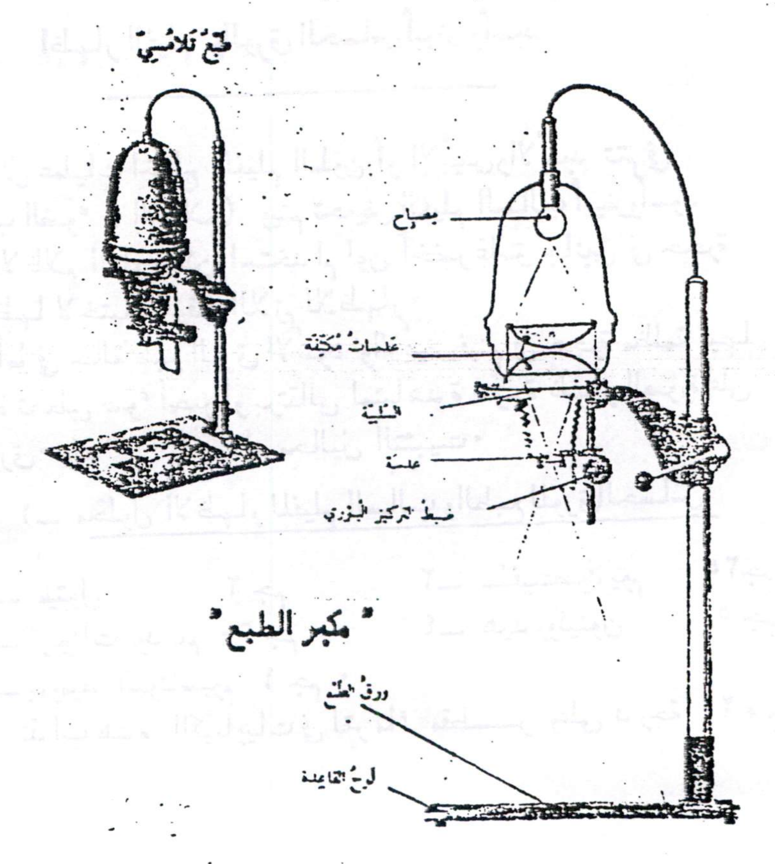
أما الورق الحساس بعد الطبع عليه بالمكبر الموضح (بالشكل) فتوضع بمحلول الاظهار حتى تظهر الصورة واضحة ثم تغمس فى الماء وتنقل الى المثبت · وكذلك الفيلم يغمس فى حوض ماء وينقل الى المثبت بعد ذلك ·

٢ـ محلول التثبيت :

١ـ ثيوسلفيت الصوديوم .... ٢٠٠ جم
٢ـ سلفات البوتاسيوم .... ٢٠ جم

تذاب فى لتر ماء مقطـــــر وتوضع فى حوض خاص

ويمكن اضافة بضع نقط من حمض الخليك الثلجى لتحسين خواص المثبت · تثبت به درجة الاظهار للفيلم وللورق الحساس بغمرها فيه لمدة ١٠ الى ٢٠ دقيقة حسب نوع الفيلم والورق · ثم الغسيل فى الماء والتجفيف ·



" مكبر الطبع "

المراجــــع

R E F E R E N C E S

Berman, M. (1982). " How to dissect"
Arco Publishing, inc. New York.

Bradbury, M. A. (1977). Hewer's Textbook of
Histology Medical Students.
E L S B , LTD , London.

Junqueira, L. C. and J. Carneiro (1983).
" Basic Histology" Lange Medical
Publications, Drawer L., Los Altos
California.

Weesner, F. M. (1966). General Zoological
Microtechniques. The Williams &
Company. Baltimore Scientific Book
Agency. Calcutta.

المراجع العربية :

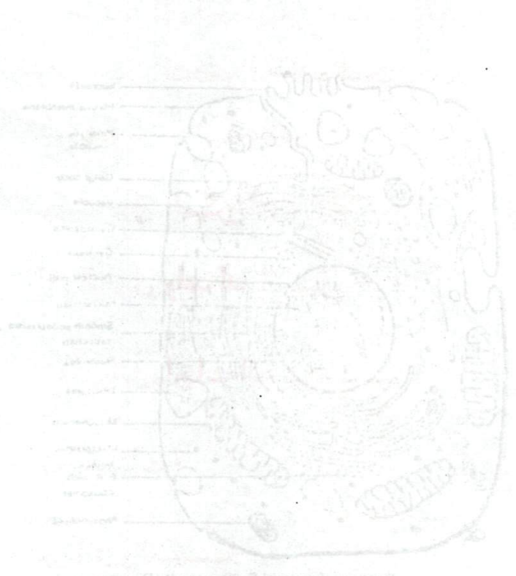
د . أحمد حسنين القفل (١٩٦٨) . " مبادئ التشريح المجهـــــري " مطبعة العلوم بالقاهرة .

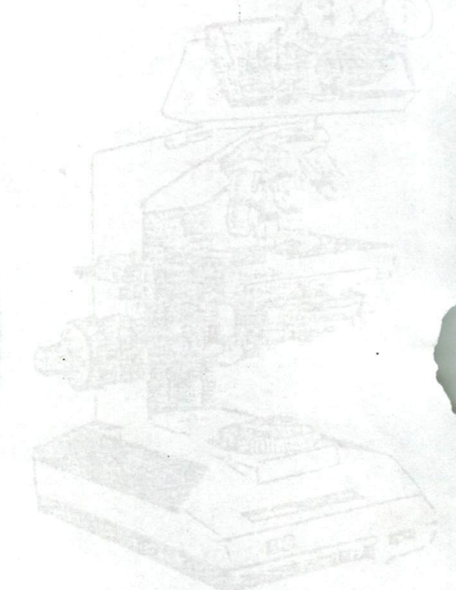
د . أحمد حماد الحسيني (١٩٦١) بيلوجيا الحيوان العملية
دار المعارف ــ القاهرة .

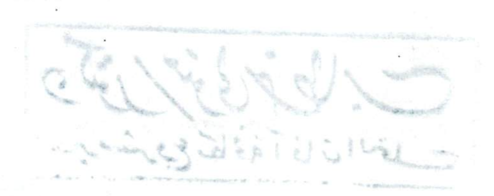
د . سعد الدين حافظ (١٩٥٥) فسيولوجيا الحيوانات الزراعية
القاهــــرة .

محتويات كتاب الميكروتكنيك والتصوير العلمى

=============







GENERAL MICROTECHNIQUES

AND

PHOTOGRAPHIC

. Structure of a typical Eucaryotic cell (Diagrammatic).

Dr. METWALLY M. KHATTAB Dr. A. I, EL-FIKY

Eng. ALI S. HASSAN

(1988)